



Polymorphisme du gène NCR3/NKp30 et variabilité de la fonction des cellules Natural Killer humaines

Nathalie Germaud

► To cite this version:

Nathalie Germaud. Polymorphisme du gène NCR3/NKp30 et variabilité de la fonction des cellules Natural Killer humaines. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T046 . tel-00789417

HAL Id: tel-00789417

<https://theses.hal.science/tel-00789417>

Submitted on 18 Feb 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

ECOLE DOCTORALE Gc2iD

Thèse pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Sciences de la Vie et de la Santé

Discipline : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par :

Nathalie GERMAUD

Le 21 novembre 2012

**Polymorphisme du gène NCR3/NKp30 et
variabilité de la fonction des cellules Natural Killer humaines**

JURY :

Pr Henri-Jean GARCHON, Directeur de thèse

Pr Daniel OLIVE, Rapporteur

Dr Thierry ROSE, Rapporteur

Pr Antoine TOUBERT, Examineur

Pr Isabelle BOURGAULT, Examinatrice

Dans les sciences, le chemin est plus important que le but.

Les sciences n'ont pas de fin,

Erwin Chargaff

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Madame le Professeur Isabelle Bourgault et Monsieur le Professeur Antoine Toubert, pour le grand honneur qu'ils me font d'être membres de mon jury. Qu'ils reçoivent l'expression de ma vive reconnaissance.

Mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Daniel Olive et à Monsieur le Docteur Thierry Rose qui ont accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Merci pour leurs précieux commentaires qui m'ont permis d'améliorer mon manuscrit.

Monsieur le Professeur Henri-Jean Garchon, Directeur de ma thèse, je voudrais vous témoigner ma profonde admiration pour vos connaissances sur le contrôle génétique des maladies multifactorielles. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée en me confiant ce sujet. Votre disponibilité et vos conseils ont été indispensables à la réalisation de ce travail. Recevez l'expression de toute ma gratitude.

Madame le Docteur Anne Caignard, je vous remercie pour votre bienveillance et votre gentillesse. Vos connaissances sur l'immunologie des cellules NK humaines dans le contexte tumoral et vos conseils judicieux m'ont guidée durant l'évolution de mon sujet de thèse. Lors de notre collaboration j'ai pu travailler avec plaisir avec Giulia et Meriem. Giulia, je ne saurai jamais comment te remercier. Tu m'as enseigné l'art de manier les cellules NK humaines et tu m'as donné des conseils avisés pour mener à bien mon projet, « Grazie mille » !

Monsieur le Directeur de l'Institut Cochin, Docteur Pierre-Olivier Coureau, je vous adresse toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de l'Institut et pour m'avoir ainsi permis de profiter des différentes plateformes. Merci à Franck de la plateforme de génomique, à Agathe de la plateforme de séquençage ainsi qu'à Muriel de la plateforme d'immuno-biologie, pour leurs précieux conseils. Monsieur le Directeur, je tiens également à vous adresser toute ma gratitude pour le soutien constant, aussi bien financier que moral, que vous apportez à l'association des Jeunes Chercheurs de l'Institut Cochin (JeCCo). Grâce à JeCCo, ces 3 années passées à l'Institut Cochin ont été riches en découvertes intellectuelles (organisation de séminaires scientifiques, de petits-déjeuners d'insertion professionnelle, etc ...) et bien sûr, humaines (Sophie, Sandra, Pablo, Nico, Quitterie, Laura, Marine, Maria et j'en oublie !...).

Un merci tout particulier à MAV, véritable mère-poule des jeunes chercheurs de Cochin, luttant contre les précarités.

Merci à la Fondation pour la Recherche Médicale qui a soutenu financièrement une partie de mon sujet de thèse.

Un grand merci également aux infirmières et aux donneurs de sang de l'Etablissement Français du Sang de l'hôpital Saint-Vincent-de-Paul. Sans eux, ce projet n'aurait pas vu le jour.

Messieurs les docteurs Gilles Chiocchia et Maxime Breban, co-directeurs de l'équipe « Inflammation chronique et système immunitaire », merci de m'avoir accueillie dans votre équipe et aiguillé tout au long de l'évolution de mon sujet de thèse.

Un grand merci aux membres actuels et aux ex membres de l'équipe « des Hardys » avec qui j'ai partagé ces 3 années de thèse. Didier, grand sage de notre labo, je t'adresse toute ma gratitude pour tes conseils. Catherine, Ourdia, Sylvie, Marie-Agnès, Léa, Carmen, Gilles « Pas chef », Franck, Yannick, Jérôme, Marion, Claudine,... Romero, merci pour ta bonne humeur constante (et ta version très personnelle de la chanson de ce cher Carlos donnant : « Nathalie, Nathalie, Oh ! »). Nelly, véritable gardienne du L2, merci de m'avoir appris les bonnes pratiques dans ce conditionnement. Matthieu, j'ai une profonde admiration pour tes connaissances scientifiques et tes qualités humaines. Tu as une équipe de choc avec Nada et Clotilde, toujours souriantes et motivées. Luiza, j'ai apprécié chercher avec toi à maîtriser le logiciel FlowJo dans les moindres détails!

Simon, merci d'avoir contribué à mon intégration dans le laboratoire et dans JeCCo. Merci également à Félicie, Valérie, Cindy, Isabelle...

Amir, tu as été un véritable coach pour moi durant les moments de doutes, même si tu en as profité pour t'attaquer à mon chocolat ! Alice, merci d'avoir tenté de m'inculquer à chaque déjeuner un peu de culture générale! Greg, tu m'as fait découvrir la magie des « manip' » de biologie moléculaire avec grande pédagogie. Je te souhaite de faire une belle carrière. Emna, bon courage pour la poursuite de ta fin thèse, attention le temps passe vite !

Merci également aux stagiaires qui contribuent et ont contribué à l'enrichissement de notre équipe : Dulani, Adèle, Aurélie, ... et bien d'autres encore ! Une « petite pensée » également aux exilés du fond du couloir : Maxime, Monsieur Zen, Maeva, toujours le sourire aux lèvres et enfin Muriel, et ses gaffes incessantes !

Je ne peux que remercier mes colloc' de bureau, Brigitte, Ingrid et Manu, pour m'avoir supportée dans les grands moments de stress mais aussi pour les intéressants moments de débats scientifiques et « culturels » !

Aurore, Barbara, et non je ne vous ai pas oubliées ! Comment le pourrais-je ? Vous m'avez été d'un soutien incroyable dans les diverses étapes de ma thèse. Vous êtes également devenues de vraies amies.

Durant mes deux années à Necker (de master 2 et de première année de thèse), j'ai eu l'immense chance de croiser le chemin :

- d'Emilie qui m'a enseigné, avec rigueur, les méthodologies fondamentales pour la réalisation de diverses techniques de biologie cellulaire,
- de Raouf, avec qui j'ai pu m'initier aux débats scientifiques et aiguïser mon esprit critique,
- d'Elvire, avec qui j'ai aussi bien partagé des moments délicats que de sympathiques soirées culinaires : Merci !

Enfin, mes remerciements les plus chaleureux sont destinés à ma famille et à mes chers amis qui ont suivi mon aventure de près ou de loin... Sans vous et sans votre soutien, je n'y serais jamais arrivée.

Sophie, Rodolphe, Besma, Max, Carole, Céline, Say, Gillou, Pierre, Ronan, ... , merci pour tous ces moments tellement agréables passés ensembles qui représentent à chaque fois, pour moi, une véritable bouffée d'air frais. Votre joie de vivre et votre éternel optimisme m'ont permis d'aller jusqu'au bout de cette épreuve.

Papi, Mamie, j'aurais tant aimé que vous puissiez voir où je suis arrivée, cela grâce à l'exemple de persévérance et de travail que vous m'avez donné.

Papa, Maman, vous avez probablement vécu ces 4 années de thèse avec presque autant d'intensité que moi. Merci d'avoir su m'écouter, me conseiller et me soutenir dans les moments difficiles. Vous ne pouvez savoir à quel point je vous en suis reconnaissante. Je vous dédie cette thèse, avec tout mon amour.

Polymorphisme du gène NCR3/NKp30 et variabilité de la fonction des cellules Natural Killer humaines

Les cellules Natural Killer (NK) sont non, seulement de précieux effecteurs cytotoxiques de la réponse immunitaire innée dirigée contre les tumeurs et les infections, mais aussi d'importants immunorégulateurs. Leur activation dépend d'une balance complexe entre des signaux émanant de multiples récepteurs, tantôt inhibiteurs, tantôt activateurs. Parmi les récepteurs activateurs, NCR3 représente un acteur important de la lyse tumorale et de l'interaction avec les cellules dendritiques.

Dans le but de caractériser la variabilité interindividuelle de la réponse NK et d'établir une référence pour des études ultérieures dans un contexte pathologique, nous avons examiné, dans un échantillon de 43 donneurs sains, les corrélations entre la variabilité fonctionnelle des cellules NK en réponse à la stimulation de leur récepteur NKp30 et le niveau d'expression des transcrits de NCR3 ainsi que celui de la protéine correspondante, au regard du polymorphisme génomique. Nous avons mis en évidence une étroite corrélation entre l'expression membranaire de NKp30 et NKp46 et la fonction cytotoxique NK, mais pas avec la sécrétion de cytokines. Nous avons retrouvé l'effet déjà connu du variant rs986475 sur l'expression de l'un des transcrits alternatifs de NCR3, T3. Nous avons également identifié un autre variant, rs11575836, influençant le niveau de transcrits T1, en relation avec la cytotoxicité induite par la signalisation NKp30. Cette étude pointe le doigt sur la spécificité des voies de signalisation des fonctions NK et le réseau complexe de gènes impliqués dans leur régulation.

Nous avons par ailleurs évalué la variabilité génétique de NCR3 dans la myasthénie auto-immune où les cellules NK pourraient jouer un rôle. Le re-séquençage du gène NCR3 n'a pas révélé d'association avec un polymorphisme commun mais a permis d'identifier deux mutations rares, « faux-sens », retrouvées uniquement chez des patients myasthéniques. L'une d'elle, L19R, est non-conservative et représente un candidat particulièrement intéressant à examiner en détail du fait de sa localisation dans une région très conservée dans la phylogénie.

Même si de nombreux points restent à élucider, ces résultats indiquent qu'il devrait être possible de relier de façon globale et intégrative le polymorphisme de l'ADN, ainsi que l'expression des transcrits et des protéines, à la réponse fonctionnelle des cellules NK.

Mots-clés : Cellules NK, NCR3/NKp30, SNP, régulation, activation, cytokines, cytotoxicité, variabilité interindividuelle.

NCR3/NKp30 gene polymorphism and variability of human Natural Killer cell function

Natural Killer (NK) cells are not just invaluable cytotoxic effectors of innate immune response against tumors and infections but also important immunoregulators. They are activated by an intricate balance between signals provided by their inhibitory and activating receptors. Among activating receptors, NCR3 can mediate tumor lysis and dendritic cell maturation making it a crucial receptor in NK cell function. Furthermore, a recent study showed that alternative splicing of NCR3 can affect NK cell function and patient responses to treatment.

In order to characterize interindividual variability of NK cell response and to set up a reference for future investigations in pathologies, we investigated 43 healthy donors and studied correlations between NK cell functional variability in response to NKp30 triggering with NKp30 transcript and membrane expression in light of genomic polymorphism. We showed a tight correlation between membrane expression of NKp30 and NKp46 with the cytotoxic NK cell response but not with cytokine secretion. In addition, we identified a new variant influencing T1 NCR3 transcripts, rs11575836, which is associated with NKp30-induced cytotoxicity. This study pointed out the specificity of pathways underlying NK cell function and the complexity of gene networks involved in their regulation.

NCR3 genetic variability was also assessed in myasthenia gravis, an autoimmune disease where NK cells seem to be implicated. NCR3 re-sequencing did not show any association with common polymorphisms but disclosed two rare nonsense mutations that were found only in patients. One of them, L19R, a non-conservative amino acid change, is of particular interest because it is located in a highly-conserved region across phylogeny.

Although numerous issues remain to be clarified, our results indicate that it should be possible to integrate information of DNA polymorphism, with that of transcript and membrane protein expression to identify functional patterns in NK cell response.

Keywords : NK cells, NCR3/NKp30, SNP, regulation, activation, cytokines, cytotoxicity, interindividual variability

ABBREVIATIONS

ACTB: Actine β
ADCC: cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
(Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity)
ADN: Acide Désoxyribonucléique
ADNc: ADN complémentaire
AF-488: Alexa Fluor-488
ARN: Acide Ribonucléique
ARNm: ARN messenger
APC: Allophycocyanine
BAT3: HLA-B-associated transcript 3
CD: Cluster de Différentiation
c-kit : Récepteur du Stem Cell Factor (ou CD117)
CLP: Common Lymphoid Progenitor
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV: cytomégalovirus
CSH: Cellules Souches Hématopoïétiques
CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène
DC: Cellule Dendritique (« Dendritic Cell »)
DNAM-1: DNAX Accessory Molecule-1
dNTP: déoxyriboNucléotide Tri-Phosphate
DT1: Diabète de type 1
EAMG: Myasthénie autoimmune expérimentale
(« Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis »)
FcR: Récepteur au fragment Fc des immunoglobulines
FITC: Fluorescéine
GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GIST: sarcome gastrointestinal
GM-CSF: Granulocyte and Macrophage - Colony Stimulating Factor
HCMV : CMV humain
HLA: Human Leukocyte Antigen
ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN γ : interferon- γ
Ig: immunoglobuline
IL-: Interleukine -
ILT: Immunoglobulin-Like Transcripts
iNK: NK immature
ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif
ITIM: Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif

KIRs: Killer Immunoglobulin-like Receptors
LAM: Leucémie Aiguë Myéloblastique
LAMP-1: Lysosomal-Associated Membrane Protein-1
LB: Lymphocyte B
LFA-1: Leukocyte Function-associated Antigen-1
lncRNA: long non-coding RNA
LST-1: Leukocyte-Specific Transcript -1
LT: Lymphocyte T
mAb: Anticorps monoclonal (monoclonal Antibody)
MAF : Fréquence de l'Allèle Mineur
MCMV : CMV murin
mDC: DC myéloïde
MFI: Mean Fluorescence Intensity
MG: Myasthénie auto-immune (Myasthenia Gravis)
MICA (ou B): MHC-class I-related chain A (ou B)
MIP-1 β : Macrophage Inflammatory Protein-1 β
miRNA : microARN
MO: Moelle Osseuse
N-CAM: Neural Cell Adhesion Molecule
NCR: Natural Cytotoxicity triggering Receptor
NK: (cellule) Natural Killer
NKG2: Natural-Killer Group 2 receptor
NOD : Nonobese Diabetic (modèle murin du diabète de type 1)
PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells
pDC: DC plasmacytoïde
PE: Phycoérythrine
PMA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
pb : paire de bases (- kb : kilobase)
PCR: Polymerase Chain Reaction
p/s: penicillin-streptomycin
PR : Polyarthrite Rhumatoïde
qPCR: quantitative PCR
RAC α : récepteur nicotinique à l'acétylcholine
RPL30 : Ribosomal Protein L30
RT: Reverse Transcription
rs: reference SNP
SEP : sclérose en plaques
SNP: Single-Nucleotide Polymorphism
STAT1: Signal Transducer and Activator of Transcription factor-1
SVF: Sérum de Veau Fœtal

TA: Température Ambiante
TCR : T Cell Receptor
TLR : Toll-like Receptor
TLS : Tissus Lymphoïdes Secondaires
TNF α : Tumour Necrosis Factor α
ULBP : UL-16-Binding Protein
VHC : Virus de l'Hépatite C
VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	p.3
RESUME / ABSTRACT.....	p.6
ABBREVIATIONS.....	p.8
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	p.14
INTRODUCTION.....	p.16
I – LES CELLULES NATURAL KILLER (NK).....	p.17
<hr/>	
A) <u>Rappels historiques</u>	p.17
B) <u>Définitions communes et diversité des cellules NK</u>	p.17
C) <u>Localisation</u>	p.19
C) 1. Dans le sang périphérique.....	p.20
C) 2. Dans les OLS.....	p.20
C) 3. Autres sites où sont retrouvées des cellules NK.....	p.21
D) <u>Développement et maturation des cellules NK</u>	p.23
D) 1. Organes dédiés au développement des cellules NK.....	p.23
D) 2. Stades de différenciation des cellules NK.....	p.25
D) 3. Facteurs de transcription impliqués dans les différentes étapes de maturation.....	p.28
E) <u>Education, tolérance et mémoire NK</u>	p.31
E) 1. Education et Tolérance des cellules NK.....	p.31
E) 2. Mémoire des cellules NK.....	p.34
F) <u>Les grandes fonctions des cellules NK</u>	p.37
F) 1. Cytotoxicité des cellules NK	p.37
F) 2. Fonction de sécrétion des cellules NK.....	p.40
F) 3. Prolifération des cellules NK.....	p.41

F) 4. NK régulatrices et régulation de la fonction NK.....	p.42
<u>G) Cellules NK et immunophysiopathologie.....</u>	p.46
G) 1. Cellules NK et cancers.....	p.46
G) 2. Cellules NK dans l'immunité anti-infectieuse.....	p.49
G) 3. Cellules NK et greffe.....	p.51
G) 4. Particularité des cellules NK utérines durant la placentation.....	p.51
G) 5. Cellules NK et auto-immunité.....	p.53
<u>H) Les récepteurs des cellules NK (NKR)</u>	p.57
H) 1. Le récepteur CD16 ou FcγRIIIa.....	p.57
H) 2. Les récepteurs de la famille « Killer Immunoglobulin-like » (KIRs).....	p.58
H) 3. La famille des récepteurs « Immunoglobulin-Like Transcripts » (ILTs).....	p.62
H) 4. Les récepteurs Natural-Killer Group 2 receptor (NKG2)	p.62
H) 5. La famille des Récepteurs à Cytotoxicité Naturelle (NCRs).....	p.65
H) 6. Les corécepteurs impliqués dans la cytotoxicité des cellules NK.....	p.71
 II – LA VARIABILITE INTERINDIVIDUELLE DANS L'ESPECE HUMAINE.....	p.74
<u>A) Variabilité génétique.....</u>	p.74
A) 1. Généralités.....	p.74
A) 2. Les marqueurs de la variabilité génétique.....	p.77
A) 3. Bases de données et outils sur le génome humain.....	p.79
<u>B) Variabilité post-transcriptionnelle.....</u>	p.80
<u>C) Autres niveaux de variabilité.....</u>	p.82
C) 1. Modifications post-traductionnelles.....	p.82
C) 2. Autres mécanismes inducteurs de la variabilité interindividuelle.....	p.82

III - OBJECTIFS DE THESE.....	p.83
-------------------------------	------

RESULTATS.....p.85

- Article 1 :p.86

Variability of NKp30/NCR3 expression impinges on cytotoxic function but not cytokine production of human NK cells.

- Article 2 :p.123

Sequence analysis of the Natural Cytotoxicity Receptor 3 (NCR3) locus in patients with early-onset myasthenia gravis (MG) reveals two rare disease-associated missense variants and supports a role for NK cells in MG pathogenesis.

- Résultats complémentaires à l'article 2.....p.130

DISCUSSION/PERSPECTIVES.....p.135

BIBLIOGRAPHIE.....p.145

Liste des figures et tableaux

FIGURES :

Figure 1 : Détermination des lymphocytes NK humains en cytométrie en flux par le marquage CD3 ⁻ CD56 ⁺	p.18
Figure 2 : Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK CD56 ^{bright} et CD56 ^{dim}	p.19
Figure 3 : Sites de développement et maturation des cellules NK.....	p.25
Figure 4 : Modèle de développement et de maturation des cellules NK humaines.....	p.27
Figure 5 : Facteurs de transcription conditionnant le développement, la maturation et la fonction effectrice des cellules NK murines.....	p.29
Figure 6 : Développement des cellules NK en parallèle des lymphocytes T dans le thymus.....	p.30
Figure 7 : Modèles d'éducation NK dépendant du CMH de classe I.....	p.33
Figure 8 : Nouveau modèle de réaction immunitaire à une seconde infection : mémoire des LB/ LT et NK de type « mémoire».	p.36
Figure 9 : Balance entre signaux activateurs et inhibiteurs déterminant l'induction ou l'inhibition de la cytotoxicité NK.	p.39
Figure 10 : Visualisation de la capacité cytotoxique des cellules NK au moyen de la mobilisation du CD107a à la membrane plasmique.	p.39
Figure 11 : Régulation mutuelle entre cellules NK et DC.	p.44
Figure 12 : Mécanismes putatifs par lesquels les cellules NK favoriseraient ou au contraire inhiberaient l'auto-réactivité.	p.54
Figure 13 : Intégration des différents signaux perçus par la cellule NK face à sa cellule cible nécessaire à la détermination de l'activation ou non de la fonction NK.	p.57
Figure 14 : Différences de structures majeures entre les membres de la famille des récepteurs KIRs.	p.59
Figure 15 : Réseau des récepteurs activateurs contrôlant la cytotoxicité NK.	p.64
Figure 16 : Structure des NCRs.	p.67
Figure 17 : NCR3, du gène à la protéine.	p.69

Figure 18 : Modèle hypothétique d'interaction entre cellule NK et cellule-cible au niveau de la synapse immunologique.p.71

Figure 19 : Corécepteurs des cellules NK Humaines et leurs ligands cellulaires.....p.73

Figure 20 : Différentes étapes durant lesquelles peut se créer une nouvelle variabilité.....p.75

TABLEAUX :

Tableau 1 : Implication des cellules NK dans les maladies auto-immunes, dans des modèles murins et dans l'espèce humaine.p.54

Tableau 2 : Produits d'expression des gènes KIRs et leurs ligands HLA de classe I.p.60

Tableau 3 : Divergences entre les 3 membres de la famille NCR.p.70

INTRODUCTION

A) Rappels historiques

C'est au début des années 1970 qu'une nouvelle sous-population de lymphocytes a été décrite chez la souris pour sa capacité à lyser spontanément des cellules tumorales sans sensibilisation préalable. Ces cellules ont, de ce fait, été nommées cellules « tueuses naturelles » ou « Natural Killer » (NK) (1, 2). Par la suite, K. Kärre a émis l'hypothèse du soi manquant ou « missing self » expliquant comment les cellules NK distinguent les cellules saines des cellules modifiées (3). Selon cette hypothèse, les cellules du soi, lorsqu'elles sont saines, expriment de façon permanente une molécule particulière à leur surface dont l'expression est perdue par les cellules tumorales. Les cellules NK s'apercevant du « soi manquant » peuvent ainsi jouer leur rôle de « tueuses » sans affecter les cellules saines de l'organisme.

Entre la fin des années 1980 et le début des années 1990, la découverte des récepteurs inhibiteurs des cellules NK spécifiques du CMH de classe I chez la souris (Ly49) a constitué une avancée majeure dans la compréhension des fonctions de ces cellules (4). Cette même équipe a ensuite proposé l'hypothèse du « Licensing » en 2005 selon laquelle les cellules NK acquièrent une tolérance au soi en entrant en contact avec le CMH de classe I qui leur est présenté par les autres cellules (5). La compréhension de l'interrelation cellule NK/cellule tumorale est donc essentielle et doit être approfondie, en particulier pour mettre au point des thérapies adaptées.

Depuis leur identification, les cellules NK ont suscité des vagues d'intérêt et de désintérêt dans la Recherche en Immunologie. Ainsi, les cellules NK semblent jouer un rôle fondamental dans l'immunosurveillance des cellules tumorales mais interviennent aussi dans le rejet de greffe et dans la défense anti-virale. Enfin, diverses données récentes de la littérature suggèrent un rôle de ces cellules dans l'auto-immunité.

B) Définitions communes et diversité des cellules NK

Chez l'homme, les cellules NK ont été initialement identifiées comme des lymphocytes à larges granules (LGL) du fait de leur morphologie au microscope. Elles expriment de nombreux marqueurs lymphoïdes et partagent le précurseur lymphoïde commun (CLP) avec les autres lymphocytes.

Ce sont des lymphocytes de l'immunité innée qui, à la différence des lymphocytes B (LB) et T (LT), ne réarrangent pas de gènes de récepteur à l'antigène, TCR ou immunoglobulines (Ig). Elles reconnaissent, malgré tout, le « non-soi » ou le soi modifié à la surface d'une grande variété de cellules cibles (cellules infectées par un virus, cellules tumorales et cellules

allogéniques), sans sensibilisation préalable. Elles provoquent alors leur lyse et produisent un large panel de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance.

Chez l'Homme, ces cellules sont classiquement définies par l'expression du marqueur CD56 et l'absence de CD3, marqueur caractéristique du TCR des lymphocytes T (Fig. 1). La molécule CD56 est une isoforme de NCAM (« neural cell adhesion molecule »), structure au centre des interactions intercellulaires homotypiques et hétérotypiques. L'expression de CD56 n'est cependant pas spécifique aux cellules NK. En effet, certaines sous-populations de LT et des cellules cancéreuses l'expriment également (6). Bien que cette molécule soit utilisée pour la sélection des cellules NK humaines, son rôle dans leur fonction est encore inconnu. Il est à noter que ce marqueur n'est pas retrouvé chez la souris et que, dans ce cas, les cellules NK sont identifiées par l'expression de NK1.1 (ou CD161) (7).

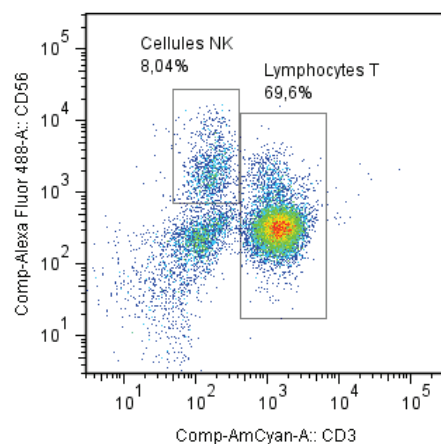


Figure 1 : Détermination des lymphocytes NK humains en cytométrie en flux par le marquage CD3⁻CD56⁺. Ces Cellules CD3⁻CD56⁺ représentent 5 à 20% des lymphocytes du sang périphérique.

Au-delà de cette définition commune, il existe une grande diversité de cellules NK. Deux grands groupes, CD56^{dim} et CD56^{bright} différenciés selon l'intensité de l'expression de CD56 à la membrane cellulaire en immunofluorescence, sont classiquement étudiés. Une autre molécule de surface est également utilisée pour classer les cellules NK, il s'agit du récepteur de faible affinité pour le fragment Fc des immunoglobulines: CD16 (ou FcγRIIIA). Tout comme pour le CD56, le CD16 n'est pas spécifique des cellules NK.

Les cellules CD56^{dim}CD16⁺, représentent 90 à 95% des cellules NK du sang périphérique (8) (Fig. 2). Elles ont une fonction effectrice cytotoxique marquée notamment par le mécanisme de cytolyse dépendant des anticorps (ADCC). Ces cellules possèdent des granules cytolytiques (contenant des perforines et granzymes) et produisent rapidement de l'IFN-γ. La sous-population CD56^{bright}CD16^{-/low}, majoritaire dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS), quant à elle, présente une activité cytotoxique marginale et semble plutôt jouer un rôle immunorégulateur par la sécrétion plus tardive mais prolongée de diverses cytokines telles que l'IFNγ, le TNFα, le GM-CSF et l'IL-10 (9) (Fig. 2).

Il est intéressant de noter qu'il existe une sous-population de cellules NK CD56⁻CD16⁺, rare chez les individus sains, mais répandue chez les patients porteurs du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (10).

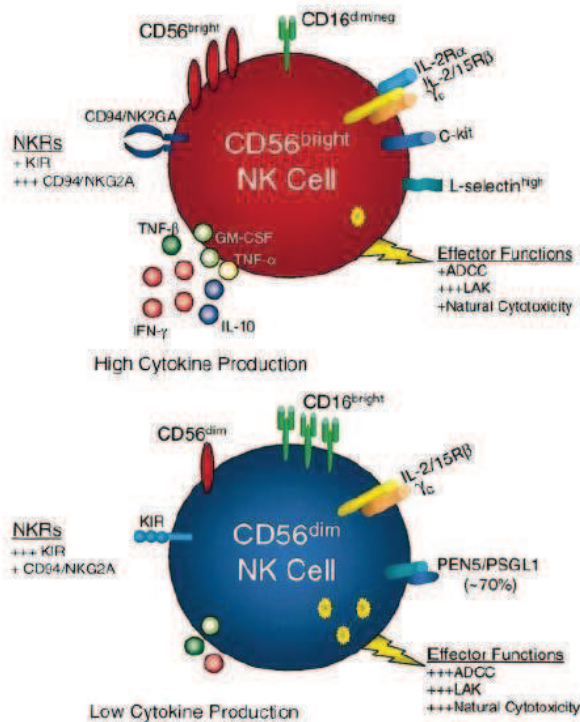


Figure 2 : Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim} (schéma extrait de Cooper MA. et al., *Blood*, 2001).

Un récepteur activateur des cellules NK, NKp46, a été proposé comme marqueur caractéristique de ces cellules dans toutes les espèces animales (11, 12). Cependant, NKp46 est aussi retrouvé à la surface de sous-populations de cellules T cytotoxiques (CTL) (13) et est absent de la surface d'une minorité de cellules NK. Il n'y a donc actuellement aucun marqueur exclusif des cellules NK.

Il est à noter que, outre le partage d'une fonction cytolytique avec les CTL, plus de 80% des cellules NK humaines expriment aussi le CD8 (14).

C) Localisation

Comme toute autre cellule du système immunitaire inné, les cellules NK circulent dans tout l'organisme (sang, foie, rate, poumons, intestins, ganglions lymphatiques...) à la recherche de cellules modifiées (tumoraux ou infectées par un virus) qu'elles pourront rapidement lyser. De ce fait, on distingue différents types de cellules NK selon les tissus et les compartiments où elles se trouvent : dans le sang périphérique, où elles représentent 5 à 10% des cellules mononucléées, dans les OLS (rate ou ganglions lymphatiques), dans le foie, au niveau de l'utérus, etc...

Chez la souris, les cellules NK sont plus fréquentes dans les organes non lymphoïdes, notamment le poumon et le foie. En nombre absolu, c'est cependant dans la rate que les cellules NK sont plus abondantes.

Chez l'Homme, de la même façon, un plus grand nombre de cellules NK est observé dans les organes non lymphoïdes tels que le foie. De surcroît, dix fois plus de cellules NK sont retrouvées dans les ganglions lymphatiques que dans le sang périphérique (12).

C) 1. Dans le sang périphérique

Les cellules NK majoritaires dans le sang périphérique ont un phénotype CD56^{dim}, les cellules CD56^{bright}, quant à elles, représentent à peine 10% des cellules NK. Les premières ont une forte activité cytotoxique alors qu'on attribue plus souvent une fonction de production de cytokines aux secondes. Au-delà de la différence d'expression du CD56 les deux populations de cellules NK se distinguent phénotypiquement par d'autres marqueurs. Les récepteurs KIRs et ILT2 sont présents en grande quantité à la surface des cellules CD56^{dim} alors que les marqueurs CD94, NKG2A et NKp46 sont plus fortement exprimés sur les cellules CD56^{bright}. On retrouve également le récepteur de haute affinité à l'IL-2 (IL-2Rα ou CD25) et c-kit (mast/stem cell growth factor receptor kit ou CD117) à la surface de ces dernières (Fig.2).

Ces deux sous-types de cellules NK ont un répertoire propre de récepteurs aux chimiokines qui permet de les discriminer. Les cellules CD56^{bright} expriment les récepteurs CCR7 et CXCR3. Les récepteurs CXCR1 et CX3CR1, quant à eux, sont exclusifs des CD56^{dim} (15). De même, les molécules d'adhésion telles que CD62L, CD54, CD2, CD11c et CD44 sont retrouvées à la surface des cellules CD56^{bright} tandis que le CD11a est exprimé par les cellules CD56^{dim} (Fig. 2) (8, 9). La répartition de ces récepteurs aux chimiokines et de ces molécules d'adhésion entre les deux populations est intimement liée à une capacité migratoire différente: les cellules CD56^{bright} se dirigent préférentiellement vers les OLS tandis que les CD56^{dim} peuvent être rapidement recrutées dans les sites inflammatoires.

C) 2. Dans les OLS

Au niveau de la rate, les cellules NK représentent en moyenne 17% des lymphocytes mais ce pourcentage varie selon les individus. Comme dans le sang périphérique, les cellules CD56^{dim} sont majoritaires et ont un phénotype similaire. Elles expriment la perforine, les NCRs, NKp30 et NKp46, ainsi qu'une partie des KIRs. On les retrouve dans la pulpe rouge, exclues des zones T et B, mais à proximité des cellules dendritiques (DC) et des macrophages (12).

Au contraire, la sous-population de cellules NK la plus importante dans les ganglions lymphatiques et les amygdales est CD56^{bright} (16) et n'exprime ni la perforine ni le CD16. La plupart d'entre elles sont également CD8⁺.

Dans les ganglions lymphatiques, les cellules NK représentent 1 à 5% des cellules mononucléées et sont localisées dans la zone T parafolliculaire (17). Leur phénotype est quelque peu différent des cellules CD56^{bright} du sang périphérique. Elles n'ont ni récepteurs KIR ni NCR, excepté de faibles quantités de NKp46. Dans les amygdales, les cellules NK sont

rares, ne représentant que 0,2 à 0,7% des cellules mononucléées. Leur phénotype est similaire à celui des NK de ganglions lymphatiques avec cependant l'expression de NKp44 et NKp46 sur certaines d'entre elles.

Cultivées en présence d'IL-2, les cellules NK CD56^{bright} des ganglions lymphatiques et des amygdales vont exprimer à leur surface les récepteurs CD16, KIRs, NCRs et la Perforine. Elles acquièrent donc un phénotype similaire à celui des NK CD16⁺ du sang périphérique avec un potentiel cytolytique.

C) 3. Autres sites où sont retrouvées des cellules NK

Le foie

Les cellules NK prédominent dans la population lymphocytaire hépatique: elles représentent plus de 50% des lymphocytes dans les foies normaux et peuvent constituer jusqu'à 90% des lymphocytes du foie pathologique (18). Ces cellules NK, tout comme les cellules NKT, aussi retrouvées en grande quantité dans le foie, participent à la réponse anti-virale et anti-tumorale (19). Les cellules NK hépatiques diffèrent des cellules NK sanguines. En effet, la majorité d'entre elles n'exprime pas le CD16, présente des récepteurs KIRs à leur surface et une plus importante densité en granules cytolytiques.

Chez la souris, les cellules NK possèdent aussi des marqueurs classiquement attribués aux DC comme CD11c. Elles ont une forte activité cytotoxique contre les cellules tumorales et produisent de grandes quantités d'IFN γ . Ces cellules peuvent également être retrouvées dans d'autres organes tels que la rate, les ganglions lymphatiques ou le thymus. Initialement décrites comme une nouvelle population cellulaire immune appelée NKDC (20) ou IKDC (IFN-producing killer DC) (21) il semblerait qu'il s'agisse plutôt d'un sous-type de cellules NK activées (22).

Les poumons

Dans les poumons, les cellules NK représentent 10 % des lymphocytes résidents. La production spontanée d'IL-15 par les cellules épithéliales bronchiques y favorise leur survie (23). Dans cet organe, les cellules NK semblent ne pas être cytotoxiques. Ceci est sans doute dû à la présence de TGF β et d'IL-10, sécrétées par les macrophages alvéolaires ; cytokines qui restreignent la réponse immunitaire en situation d'inflammation. Par ailleurs, l'IL-2 peut contrecarrer cet état anti-inflammatoire et permettre l'acquisition de la fonction cytotoxique par les cellules NK (24).

La peau

La peau constitue la première barrière immunitaire protégeant le corps de toute atteinte. Chez l'Homme, les cellules NK résident dans le derme où elles coopèrent avec les autres leucocytes : LT (LT $\gamma\delta$, T CD4⁺ « helper » 1 (Th1), Th2, Th17), mastocytes, macrophages et DC, pour maintenir l'homéostasie. Elles permettent ainsi de conserver l'intégrité tissulaire et d'éliminer les cellules en état de stress. Les cellules NK du derme constituent 10 % des leucocytes et ont un phénotype CD56⁺CD16⁻. Une sous-population de cellules NK cutanées exprime CCR8, récepteur aux chimiokines impliqué dans la localisation des cellules

immunitaires dans la peau (25). CCR7, récepteur associé à la localisation des cellules au niveau des ganglions lymphatiques est absent de la surface des cellules NK du derme. La rareté des cellules NK CCR8⁺ dans le sang périphérique indique sans doute que la peau est le site privilégié de ces cellules NK. Ces cellules ont aussi pour particularité le défaut d'expression de la perforine et d'un récepteur activateur important des cellules NK : NKG2D. Ce défaut peut être corrigé par stimulation avec de l'IL-2.

L'utérus

Les cellules NK sont abondamment représentées dans la muqueuse utérine (ou endomètre: eNK) où elles constituent 30% des lymphocytes. Leur nombre augmente de façon importante de la phase prolifératrice à la phase sécrétoire tardive du cycle menstruel mais leur pourcentage au sein des lymphocytes reste constant, le nombre de LT, population lymphocytaire majoritaire au niveau de l'endomètre, augmentant proportionnellement (26). La proportion des cellules NK s'accroît au cours de la grossesse pour atteindre 70 à 80% des lymphocytes décidaux (dNK). Ces dNK jouent un rôle important dans le remodelage de la muqueuse utérine pour permettre l'implantation du blastocyste et constituent donc la majorité des lymphocytes décidaux au premier trimestre de la grossesse. Leur nombre décline ensuite pour être faiblement présentes à terme.

Les eNK expriment un niveau intermédiaire de CD56 mais ne portent pas le marqueur CD16 et ne peuvent donc pas être distinguées en deux sous-groupes comme dans le sang périphérique (26). Elles présentent à leur surface des récepteurs inhibiteurs KIRs et les récepteurs activateurs NKp46 et NKG2D mais, à la différence des dNK, elles ne disposent ni de NKp30, ni de NKp44, ni de récepteur aux chimiokines qui pourraient expliquer leur emplacement utérin. Les eNK comportent des granules renfermant de la perforine mais ont une activité cytotoxique réduite et des difficultés à produire de l'IFN γ . L'activation de ces cellules par l'IL-15 (cytokine fondamentale dans la différenciation des cellules NK et démontrée comme importante durant la grossesse) permet probablement de rétablir la fonction effectrice cytotoxique et l'expression des marqueurs manquant. Ceci amène à penser que ces eNK seraient des dNK immatures.

La majorité des dNK sont CD56^{bright}CD16⁻ et expriment de forts niveaux de CD94/NKG2A, ressemblant de ce fait à leurs homologues sanguins. Cependant, tout comme les eNK, elles expriment aussi des KIRs et des granules cytolytiques qui les rapprocheraient alors des CD56^{dim}CD16⁺ sanguines. Des marqueurs propres à ces dNK exprimés en grande quantité en font un sous-type de cellules NK à part: le granzyme A ainsi que les récepteurs NKG2C et NKG2E. L'expression constitutive de NKp44 et de CD69 sur ces cellules suggère une activation permanente de ces dernières dans l'environnement décidual.

La faible fonction cytotoxique des dNK pourrait s'expliquer par une forte inhibition exercée par les molécules non-classiques du CMH de classe I : HLA-G et HLA-E (exprimées par les cellules trophoblastiques) interagissant avec les récepteurs des dNK : ILT2, KIR2DL4 et CD94/NKG2A. Ces dNK pourraient aussi avoir des difficultés à former une synapse mature activatrice et ne pourraient donc pas polariser la perforine (27). Il peut aussi y avoir diverses

interactions avec d'autres cellules du système immunitaire qui préviendraient les dommages tissulaires que ces dNK pourraient causer.

L'intestin grêle

Des cellules NK ont par ailleurs été identifiées dans l'intestin grêle pour la première fois par F. Leon et al. (28). Elles y expriment peu ou pas le marqueur CD16 mais acquièrent la capacité à lyser les cellules-cibles K562 après expansion *in vitro* en présence d'IL-2. Du fait de l'absence de ces cellules dans la maladie coeliaque et de leur forte ressemblance phénotypique et fonctionnelle avec les cellules NK utérines, il a été suggéré que ces cellules auraient un rôle tolérogène.

Deux organes lymphoïdes supplémentaires hébergent des cellules NK à différents niveaux de maturation: la moelle osseuse et le thymus (sujet développé dans la section suivante).

D) Développement et maturation des cellules NK

Avec une demi-vie de 7 à 10 jours en périphérie, les cellules NK matures ont une durée de vie limitée (29). Leur renouvellement doit donc être constant pour maintenir l'homéostasie.

Les lymphocytes NK dérivent de cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34⁺. Initialement, il a été postulé qu'elles sont issues du progéniteur commun des cellules lymphoïdes (CLP) tout comme les LT et les LB (30). Des études ultérieures ont mis en évidence l'obtention de cellules NK également à partir de progéniteurs exprimant des antigènes myéloïdes en provenance du sang de cordon ombilical (31). Récemment, il a été montré que les cellules NK générées à partir de progéniteurs myéloïdes ont un phénotype proche des CD56^{dim} alors que celles obtenues *in vitro* à partir de CLP sont CD56^{bright} (32). Ces expériences évoquent ainsi une origine non seulement lymphoïde mais aussi myéloïde des cellules NK.

Il est possible de différencier des CSH en cellules NK *in vitro* en présence des cytokines IL-2 et/ou IL-15 (33) et/ou de cellules stromales de la moelle osseuse. D'autres facteurs comme le SCF (Stem Cell Factor ou c-kit ligand) et Flt3L (Fms-like tyrosine kinase-3 Ligand) participent à l'induction de l'expansion des précurseurs hématopoïétiques précoces en réponse aux cytokines IL-2 et IL-15 (34). En effet, l'IL-15 joue un rôle majeur dans l'homéostasie des cellules NK périphériques : elle promeut la prolifération des cellules NK matures *in vivo* (35).

D) 1. Organes dédiés au développement des cellules NK

La moelle osseuse (MO) est considérée comme le premier site de génération des cellules NK car elle contient les substrats cellulaires et les facteurs solubles requis pour leur

maturation. L'ablation de la MO chez la souris entraîne une diminution de l'activité cytotoxique et du nombre des cellules NK en périphérie suggérant ainsi l'importance de cet organe pour la maturation des cellules NK (36). Chez l'Homme, des études ont démontré le rôle des cellules stromales de la MO dans le développement des cellules NK en réalisant *in vitro* une différenciation de cellules CD34⁺ en présence de cellules stromales de MO (37, 38).

Le thymus est également considéré comme un site de développement des cellules NK. En effet, il est possible de retrouver un petit nombre de cellules NK avec un phénotype mature (ayant acquis leur fonction cytotoxique et de producteur de cytokines) mais aussi des précurseurs multi-potents et bi-potents (T/NK et NK/DC) dans les thymus murins (39). Chez l'homme les données sur le développement des cellules NK dans le thymus sont très limitées (40). Les voies de différenciation thymique restent encore à approfondir.

Les cellules NK se développent-elles et acquièrent-elles une maturité selon un processus similaire à celui qui se déroule dans la MO ? Quelle peut être la fonction des cellules NK dans le thymus : moduler la thymopoïèse ? maintenir l'architecture thymique ? surveiller la transformation des thymocytes ? A cet égard, il a été démontré que les cellules NK peuvent lyser des thymocytes.

Les tissus lymphoïdes secondaires (TLS), quant à eux, semblent jouer un rôle essentiel dans la maturation finale des cellules NK humaines. Des précurseurs de ces cellules NK ont d'ailleurs été retrouvés dans les ganglions lymphatiques.

Une des hypothèses actuellement défendues serait donc que les précurseurs issus des CSH de la moelle osseuse peuvent, à certains stades du développement, migrer vers différents organes pour compléter leur différenciation (Fig. 3). Le microenvironnement dans lequel se retrouvent ces précurseurs jouerait alors un rôle prépondérant dans la diversification des cellules NK et donc dans leur hétérogénéité. Des questions restent encore en suspens en ce qui concerne le développement et la différenciation des cellules NK dans de multiples sites, sur l'influence du microenvironnement dans cette différenciation/maturation et sur la stabilité des phénotypes et fonctions acquis par les cellules NK.

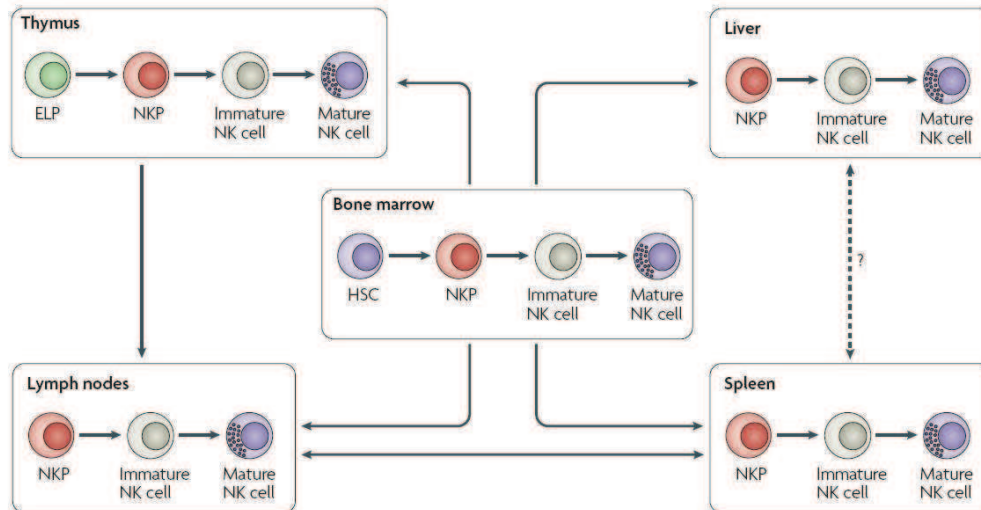


Figure 3 : Sites de développement et de maturation des cellules NK. De nombreux précurseurs des cellules NK peuvent être retrouvés dans le sang périphérique ainsi que dans divers organes lymphoïdes tels que la rate, les ganglions ou le thymus (D'après Huntington ND et al., *Nature Rev. Immunol.*, 2007). ELP: Early Lymphoid Progenitor. NKP: NK cell Precursor.

Au cours de la différenciation des CSH en cellules NK, l'expression de la molécule de surface CD34 est progressivement perdue tandis que d'autres marqueurs associés à la lignée NK, dont un ensemble de récepteurs activateurs et inhibiteurs dirigeant leurs fonctions de cytotoxicité et de production de cytokines, apparaissent.

D) 2. Stades de différenciation des cellules NK

Indifféremment du site, plusieurs stades de différenciation ont été identifiés *in vivo*. Les précurseurs des cellules NK (NKP) dérivent de précurseurs hématopoïétiques multipotents et de précurseurs lymphoïdes précoces (ELP) présentant le phénotype $CD34^+CD38^+CD45RA^+$. Ces NKP ont uniquement le potentiel de se différencier en cellules NK. Les cellules NK immatures (iNK) proviennent des NKP qui vont se mettre à exprimer le CD161 (ou KLRB1, « killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1 ») et certains marqueurs « NK » comme le récepteur NKG2D. Ces dernières se différencient ensuite en cellules NK matures (41), qui vont présenter à leur surface tout un panel de récepteurs activateurs et inhibiteurs. Elles vont alors acquérir leurs capacités fonctionnelles au travers de l'interaction entre leurs récepteurs inhibiteurs et les molécules du soi que sont les CMH de classe I durant un processus appelé « éducation » des cellules NK (42) qui sera discuté ci-après.

Ces étapes de maturation des cellules NK sont très similaires chez l'Homme et la souris. Chez la souris, le modèle de différenciation cellulaire repose sur les marqueurs CD27 et CD11b. A partir du phénotype originel $CD11b^{low}CD27^+$, les cellules passent par un stade intermédiaire de maturation $CD11b^{hi}CD27^+$ pour arriver au phénotype final : $CD11b^{hi}CD27^-$.

Les cellules arrivées à ce stade correspondent au sous-type de cellules NK CD56^{dim} de l'espèce humaine (43).

Cinq stades consécutifs et fonctionnellement distincts ont été identifiés au cours du développement des cellules NK humaines dans les TLS au moyen de trois marqueurs : CD34, CD117 (ou c-kit) et CD94 (44) (Fig. 4).

Etape 1 :

Etape des progéniteurs des cellules NK (pro-NK) de phénotype CD34⁺(CD45RA⁺)CD117⁻CD94⁻. Ces cellules sont caractérisées par l'absence d'expression de CD122 (sous-unité β du récepteur à l'IL-2 et à l'IL-15) et par un défaut de réponse à l'IL-15. Suite à une courte stimulation avec le ligand de Flt3, l'IL-3 et l'IL-7, une partie de ces cellules acquiert le phénotype de stade 2. A ce niveau, elles sont encore multi-potentes et peuvent donc encore se différencier en lymphocytes T ou en DC myéloïdes.

Etape 2 :

Les cellules pro-NK deviennent des pré-NK exprimant CD117 (ou c-kit), de phénotype CD34⁺(CD45RA⁺)CD117⁺CD94⁻. A ce stade, les cellules pré-NK ont acquis la capacité de répondre à une stimulation par l'IL-15 (ou l'IL-2) mais sont également encore disposées à donner des LT ou des DC *in vitro*. Ceci suggère une certaine plasticité d'une fraction de ces pré-NK.

Etape 3 :

Etape des cellules NK immatures (iNK) caractérisées par la perte de l'expression du CD34 : phénotype CD34⁻CD117⁺CD94⁻.

Les iNK ne peuvent plus se différencier en LT ou DC, elles n'expriment plus les marqueurs associés aux autres lignées sanguines. Elles commencent à exposer à leur membrane des antigènes associés aux cellules NK: CD56, CD2, 2B4, NKp44, CD7, CD161. Ces cellules se distinguent aussi des pré-NK par l'expression uniforme de CD127 (IL-7R α) et la grande quantité d'ARNm de CD122 (ARN à peine détectables dans les pré-NK). Elles sont malgré tout encore incapables de produire de l'IFN γ ou de la perforine et n'expriment pas les récepteurs CD94/NKG2A, KIRs, NKp46, NKG2D et CD16, mais peuvent sécréter du GM-CSF lorsqu'elles sont stimulées par du phorbol myristate acétate (PMA), de la ionomycine et de l'IL-2.

Etape 4 :

Cellules NK CD56^{bright}, CD34⁻CD117^{+/-}CD94⁺CD56^{high}.

Arrivées à ce stade, les cellules NK ont acquis l'expression des récepteurs CD94/NKG2A, NKG2D et NKp46 tandis que l'exposition des molécules CD117 et CD127 à leur membrane diminue. De plus, les cellules sont à présent capables de sécréter de l'IFN γ et de lyser des cellules par le mécanisme dépendant de la perforine.

Etape 5 :

Les cellules NK CD56^{dim}, caractérisées par le phénotype CD34⁻CD117^{+/-}CD94⁺CD56^{low}, expriment dorénavant à leur membrane les récepteurs KIRs et le CD16.

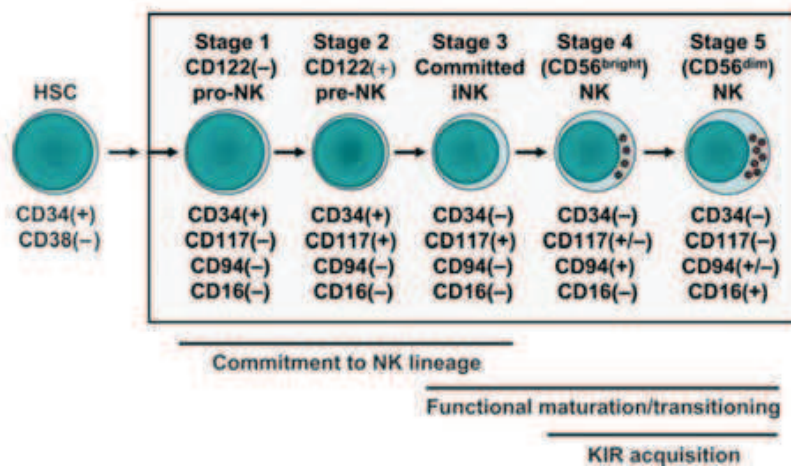


Figure 4 : Modèle de développement et de maturation des cellules NK humaines. Distinction selon les marqueurs CD34, CD117, CD94 et CD16 (d'après Freud & Caligiuri, *Immunol. Rev.*, 2006).

Selon ce modèle, les cellules CD56^{dim} dérivées des CD56^{bright} sont considérées comme les cellules NK les plus matures. D'autres exemples dans la littérature appuient cette hypothèse comme l'étude de C. Romagnani et al., dans laquelle les cellules CD56^{bright} disposent de télomères plus longs que les cellules CD56^{dim} (45). En effet, d'après cette méthode de mesure, utilisée auparavant pour caractériser les lymphocytes T naïfs et mémoires, la longueur des télomères diminue avec la division cellulaire (46). D'autre part, il est possible d'obtenir des cellules CD56^{dim} à partir de cellules CD56^{bright} *in vitro* lors d'une co-culture avec des fibroblastes de tissus périphériques (47). Cependant, il est à noter que l'expression de CD56 augmente entre le stade 2 et le stade 4 de différenciation des cellules NK dans les TLS et que la majorité des cellules CD3⁻CD56^{dim} dans le stade 3 sont des cellules iNK. De ce fait, le niveau d'expression du CD56 à lui seul ne permet pas de caractériser finement les intermédiaires de maturation des cellules NK.

Récemment, deux travaux ont permis d'approfondir les distinctions dans la maturation finale des cellules NK CD56⁺. D'une part, l'équipe de M.A. Caligiuri a caractérisé les cellules CD94^{high}CD56^{dim} comme intermédiaires entre les précurseurs CD94^{high} et les cellules matures CD94^{low}CD56^{dim} (48). D'autre part, le groupe de V. Vieillard s'est basé sur les niveaux d'expression des récepteurs inhibiteurs NKG2A et KIRs pour définir les dernières étapes allant des cellules CD56^{bright} aux CD56^{dim}: les cellules CD56^{dim}NKG2A⁺KIR⁻ issues des CD56^{bright}NKG2A⁺KIR⁻ se différencient tout d'abord en CD56^{dim}NKG2A⁺KIR⁺ pour finir par arriver à un phénotype CD56^{dim}NKG2A⁻KIR⁺ (49).

Un dernier marqueur, CD57, retrouvé à la surface des LT CD8⁺ matures, a finalement été associé à un phénotype de cellules NK humaines matures (50). CD57 est en effet exprimé sur 30 à 60% les cellules CD56^{dim}CD16⁺ décrites précédemment comme matures alors que moins de 1% des NK CD56^{bright} l'expriment. Les NK CD56^{bright} ont de plus fortes densités en

NKp46, NKp30, NKG2A et NKG2D. Au cours des derniers stades de maturation, la densité en marqueurs CD56 et NCRs diminue alors que les cellules NK CD56^{dim} se mettent à exprimer CD16, KIRs, 2B4 et LIR-1. CD57 indiquerait donc un stade de maturation final au sein des cellules CD56^{dim}CD16⁺. Ces cellules les plus matures sont alors caractérisées par une capacité proliférative réduite et une meilleure cytotoxicité induite par CD16 (50).

D) 3. Facteurs de transcription impliqués dans les différentes étapes de maturation

Par comparaison avec le développement des LT et des LB pour lesquels un programme transcriptionnel détaillé a été établi, les bases de la régulation transcriptionnelle de la maturation des cellules NK commencent tout juste à être identifiées. Différents facteurs de transcription contribuant au développement précoce des lymphocytes NK ont été mis en évidence récemment chez la souris (Fig. 5).

Les trois membres de la famille Ets : PU-1, Ets-1 et Mef, jouent un rôle dans le développement des cellules NK murines (51-53) :

Ets-1 est largement retrouvé dans les cellules lymphoïdes et y joue de multiples rôles dont celui de régulateur de la production de cytokines. C'est un facteur critique dans le développement des cellules NK. En effet, les cellules NK sont trois fois moins nombreuses dans la rate ou les ganglions lymphatiques de souris dont le gène Ets-1 a été invalidé et ont une fonction également fortement diminuée (51). Ets-1 est faiblement exprimé aux stades de maturation 1 et 2 dans les TLS ; son niveau augmente au stade 3 pour rester élevé au stade 4. Ce doit être un facteur essentiel à la différenciation finale des cellules NK. Le mécanisme et les gènes cibles au travers desquels Ets-1 contrôle la différenciation des cellules NK doivent encore être approfondis.

Il a été montré chez la souris PU-1 KO que l'absence de ce facteur affecte non seulement toutes les lignées lymphoïdes (dont les LB), mais aussi quelques cellules myéloïdes (comme les DC). PU-1 agit très en amont de la voie de différenciation des cellules NK et pourrait donc probablement influencer l'expression de Flt3 (54). Il devient dispensable une fois que les cellules NK matures sont formées.

Mef est un facteur de transcription codé par le gène Elf4 et présent dans les lignées lymphoïdes et myéloïdes. La délétion d'Elf4 entraîne une diminution des cellules NK et NKT en périphérie qui restent cependant détectables.

La protéine E4BP4 (« E4-binding protein 4 » ou NFIL3) est retrouvée dans les cellules hématopoïétiques ou non hématopoïétiques où elle contrôle divers processus cellulaires. Les souris E4BP4^{-/-} présentent une perte importante en cellules NK matures en périphérie alors que les proportions en LB et LT restent inchangées (55, 56).

Les protéines Id (Inhibitor of DNA binding), dont Id2 et Id3, jouent un rôle essentiel dans le développement des cellules NK (57). Elles sont retrouvées dans les NKP. La protéine

Id2 est le membre de la famille Id prédominant dans les cellules NK matures (58). L'inactivation du gène codant pour Id2 dans la MO provoque un blocage du développement des cellules NK à un stade entre NKP/iNK et mNK.

Ikaros est un facteur de transcription faisant partie de la famille Ikaros avec deux autres membres, Helios et Aiolos. Il est exprimé durant l'hématopoïèse dans les CSH, CLP, LB et LT en phase de développement, et dans les LT, LB et NK matures (59) (60) (61). Il est connu que son absence est associée à une diminution de Flt3 et CD122 et donc à une atteinte des cellules mNK ; mais il reste à découvrir à quel stade de développement il intervient : au stade NKP ou à des stades plus tardifs ?

Les souris dépourvues de Gata-3 et T-bet présentent une diminution des fonctions NK. T-bet est un facteur de transcription connu pour son rôle dans la différenciation des cellules CD4⁺ vers la voie Th1. Les souris KO pour le gène T-bet voient leur nombre de cellules NK matures divisé par trois dans la rate mais augmenté dans la MO (62). Le rôle de T-bet se trouverait très en amont, au niveau de la CSH. Lors du passage au stade iNK, T-bet induit l'expression du ligand de TRAIL qui va être perdue au cours de la maturation caractérisée notamment par la présence des récepteurs Ly49 chez la souris. Cette étape est régulée par Eomes (Eomesodermin). T-bet et Eomes contrôlent donc également des points-clés de la maturation des cellules NK (63).

Gata-3 est un autre facteur de transcription initialement identifié comme inducteur de l'orientation des LT CD4⁺ vers la voie « Th2 ». Ultérieurement, une voie de différenciation des cellules NK murines, dépendante de l'expression de Gata-3 et de CD127 (IL-7R α), a été mise en évidence en 2006 par C.A. Vosshenrich et al. (39). Il est d'ailleurs surprenant que Gata-3, qui est donc associé à un profil plutôt « anti-Th1 », induise la production d'IFN γ (cytokines Th1 par excellence) par les cellules NK thymiques.

L'expression de Gata-3 augmente progressivement à partir du stade 1, pour être maximale au stade 3, puis diminuer au stade 4. Ce facteur de transcription a donc un rôle en amont de la différenciation NK, au contraire de T-bet, régulateur important de l'IFN γ , peu ou pas produit dans les stades 1 à 3, mais facilement détectable au stade 4.

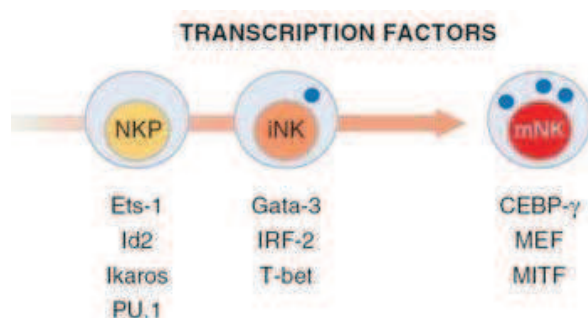


Figure 5 : Facteurs de transcription conditionnant le développement, la maturation et la fonction effectrice des cellules NK murines. Les interactions précises entre ces différents facteurs restent à élucider (d'après J.P. Di Santo, *Annu. Rev. Immunol.* 2006).

Dernièrement, L. Hidalgo et al. ont montré que les ELP $CD34^+CD1a^-$ exprimant BMPRIA, récepteur de type IA des « Bone Morphogenetic Proteins » (BMP), contiennent une grande proportion de précurseurs de cellules NK qui peuvent se différencier, en présence des cytokines adéquates et/ou de cellules stromales thymiques, pour former des lymphocytes NK matures. Les BMP peuvent promouvoir la différenciation NK thymique, en régulant l'expression de facteurs clés dans le lignage NK comme *Id3* ou *Nfil3* et le *CD122*, et en inhibant la différenciation des LT (40).

Les orientations des différents lymphocytes vers un lignage précis sont fortement liées et dépendent d'une balance entre les différents facteurs de transcription comme il l'a été montré avec *Bcl11b* (Fig.6), répresseur de transcription « Kruppel-like », qui joue un rôle essentiel dans la différenciation des LT en stimulant le réarrangement de la chaîne β du TCR. L'équipe de P. Liu a d'ailleurs rapporté que l'ablation de cette molécule dans les cellules T matures ou immatures mène à l'adoption d'un phénotype NK par ces cellules (64).

Le processus de génération des NKP à partir des CSH, et l'homéostasie des cellules NK, apparaissent donc comme étroitement contrôlés et résultent d'un équilibre entre signaux extrinsèques provenant des cellules stromales (rôle des cytokines comme l'IL-15 ou le TGF β) et signaux intrinsèques transmis par les différents facteurs de transcription.

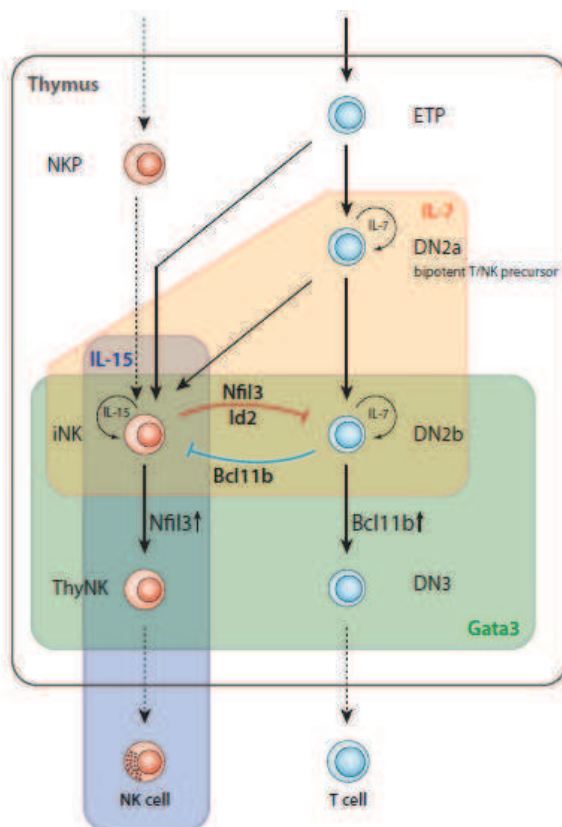


Figure 6 : Développement des cellules NK en parallèle des lymphocytes T dans le thymus (d'après K. Wolterink et al., *Immunol.Rev.*, 2010). ELP: Early Lymphocyte Progenitor. DN, « Double Negative »: ce sont des précurseurs des LT qui n'expriment ni le CD4 ni le CD8. Les cellules DN2 ont le potentiel de donner des DC, des mastocytes, des monocytes ou des cellules NK.

E) Education, tolérance et mémoire NK

Ces notions d'éducation, de tolérance et de mémoire NK sont actuellement sujettes à controverses dans la littérature. Le but est donc ici de présenter les principales hypothèses sur cet aspect de la biologie des cellules NK.

E) 1. Education et Tolérance des cellules NK

L'éducation des cellules NK ou « licensing » fait référence à un processus permettant l'acquisition d'une fonction effectrice cytotoxique efficace par les cellules NK matures contre leur cible, tout en restant tolérantes au soi. Ce processus se déroulerait dans la MO.

La plupart des récepteurs activateurs et coactivateurs exprimés sur les cellules NK murines et humaines peuvent reconnaître des antigènes du soi. NKG2D par exemple, reconnaît différents ligands endogènes. De même, plusieurs KIRs activateurs (ou Ly49 chez la souris), et les récepteurs CD94/NKG2C sont capables de reconnaître les CMH de classe I. Ou encore, des membres de la famille NCR, comme NKp30, NKp46 ou NKp44, semblent fixer des ligands du soi encore indéterminés pour le moment (65, 66).

En sachant qu'il existe un grand nombre de récepteurs activateurs qui peuvent interagir avec des ligands endogènes, comment se fait-il qu'on ne détecte pas d'auto-immunité NK ?

Au-delà de leur rôle dans la prévention de l'auto-agression des cellules de l'organisme par les cellules NK, les récepteurs inhibiteurs de ces dernières, reconnaissant les molécules de CMH de classe I, sont considérés comme le mécanisme prédominant responsable de la tolérance au soi. Trois familles de NKR reconnaissent le CMH de classe I : les KIRs chez les primates, Ly49 chez la souris et CD94/NKG2A chez les rongeurs et les primates. Les mécanismes cellulaires et moléculaires intervenant dans ce processus restent cependant encore mal connus (67).

Aussi bien chez l'Homme que chez la souris, il a été démontré qu'en absence de récepteurs inhibiteurs spécifiques du CMH de classe I, comme les KIRs ou Ly49 respectivement, les cellules NK disposent d'un phénotype mature mais sont, paradoxalement, beaucoup moins réactives (5, 42). De même, les cellules NK de souris dépourvues de β 2-microglobuline (composante du CMH de classe I), et qui n'ont donc pas pu être éduquées, ont une capacité cytolytique amoindrie face à leurs cibles ayant un défaut de CMH de classe I (68). La fonctionnalité des cellules NK, en réponse à une stimulation ciblée anti-NK1.1 chez la souris, dépend aussi essentiellement des molécules de CMH de classe I du soi. En effet, les souris KO pour le CMH de classe I ont plus de difficulté à produire de l'IFN γ en réponse à un engagement du récepteur NK1.1 que les souris sauvages. La réactivité des cellules NK dépend donc de l'expression de récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules de CMH de classe I. Autrement dit, les cellules NK qui expriment des récepteurs inhibiteurs spécifiques du CMH de classe I du soi deviennent fonctionnelles alors que celles qui n'en ont pas restent inertes. Ce « licensing » ressemble à la sélection positive

des LT dans le thymus à cela près que les récepteurs, codés de façon germinale et qui interagissent avec le CMH de classe I durant le processus d'éducation, ont ensuite une fonction inhibitrice dans la réponse effectrice NK.

Actuellement, 4 modèles (probablement complémentaires), basés sur une éducation des cellules NK par les molécules de CMH de classe I, sont proposés (69):

1/ Le modèle de « l'armement » ou « licensing » (Fig. 7a).

Ce modèle repose sur l'acquisition d'une maturation fonctionnelle des cellules NK après liaison entre les molécules du CMH de classe I et les récepteurs inhibiteurs présents sur ces dernières. La signalisation au travers de ces récepteurs inhibiteurs, par l'intermédiaire de leurs domaines ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif), promeut une maturation fonctionnelle de façon active. Les cellules n'exprimant pas ces récepteurs sont considérées comme immatures (5, 42). Chez la souris, des mutations de domaines ITIM abrogent le signal provenant des récepteurs Ly49 ce qui mène à une hypo-réactivité des cellules NK en présence de ces récepteurs (5). Les récepteurs inhibiteurs spécifiques du CMH de classe I ont ici un rôle « instructeur » qui peut être difficile à concevoir.

2/ Le modèle du « désarmement » (Fig. 7b) part du concept selon lequel les cellules NK sont réactives par défaut. Dans cette situation, les cellules NK qui n'ont pas de récepteurs inhibiteurs pour le CMH de classe I du soi sont « désarmées » afin de préserver la tolérance au soi. Elles sont rendues anergiques à la suite d'une stimulation chronique (70). Les interactions avec le CMH de classe I s'opposent à ce processus et les cellules NK peuvent alors devenir matures et fonctionnelles. Ce modèle paraît plus cohérent du fait du maintien d'un rôle plus conventionnel pour la signalisation issue des récepteurs inhibiteurs.

3/ Le modèle de l'interaction *en cis* (Fig. 7c). Ce troisième modèle est basé sur la capacité de récepteurs inhibiteurs Ly49 à fixer les molécules de CMH de classe I exprimées sur la même cellule, *en cis*, aussi bien que sur une autre cellule, *en trans* (71). Les récepteurs Ly49A peuvent, en effet, transmettre un signal inhibiteur en absence d'engagement avec leur ligand. Dans ce modèle, les interactions entre le CMH de classe I et Ly49 *en cis* induisent une séquestration des récepteurs Ly49 et empêchent leur relocalisation à la synapse immunologique. En conséquence, l'influence inhibitrice des récepteurs Ly49 non engagés sur la signalisation émanant des récepteurs activateurs diminue et les cellules NK sont alors plus réactives. La pertinence de ce système pour tous les récepteurs inhibiteurs Ly49 ou encore pour les KIRs chez l'Homme n'est pas encore clairement démontrée.

4/ Le modèle du rhéostat (Fig. 7d). Les modèles d'armement et de désarmement proposent tous les deux une éducation des cellules NK qui repose sur un signal binaire « on/off ». Contrastant avec ces deux modèles, il a récemment été mis en évidence que les cellules NK pouvaient avoir une réponse augmentée ou diminuée selon la force du signal inhibiteur qu'elles reçoivent. Ce modèle suggère que l'éducation des cellules NK s'opère de façon quantitative avec un ajustement de la réponse (vers le haut ou vers le bas) dépendant du signal inhibiteur reçu par la cellule NK (72). A.H. Jonsson et al. ont, par la suite, démontré

que l'affinité de l'interaction entre le récepteur et son ligand CMH I influence aussi le processus d'éducation des cellules NK (73). Ce dernier modèle rassemble les modèles d'armement et de désarmement et peut aussi être compatible avec celui de l'interaction *en cis*. Il apparaît donc comme le plus vraisemblable.

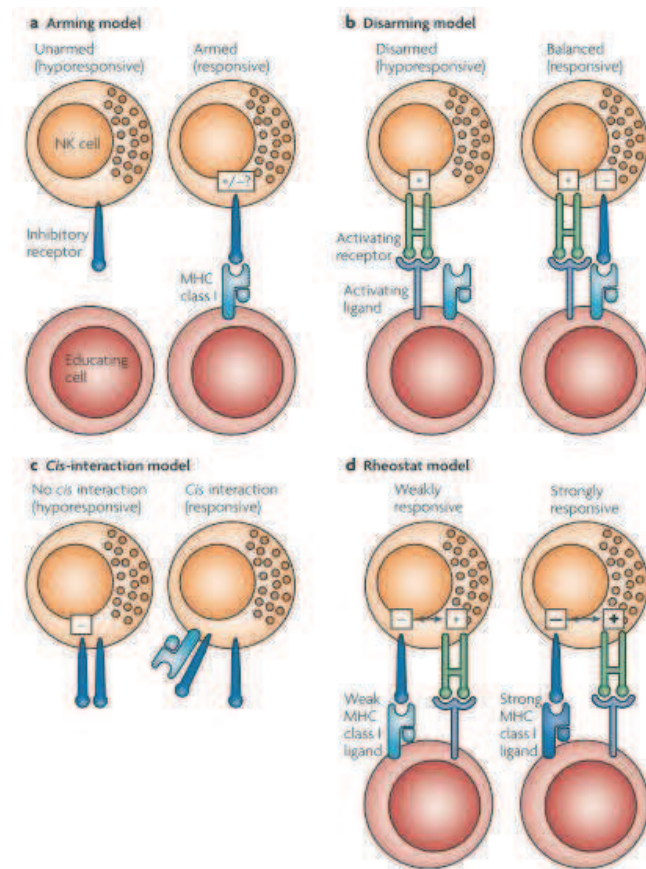


Figure 7 : Modèles d'éducation NK dépendant du CMH de classe I (schéma extrait de P. Höglund & P. Brodin, *Nat. Immunol. Rev.*, 2010). a. Modèle de l'armement : les cellules NK n'ayant pas été éduquées par le CMH I sont hypo-réactives. b. Modèle du désarmement : cellules répondeuses à l'état initial mais en anergie en l'absence de récepteurs inhibiteurs spécifiques du CMH de classe I. c. Modèle de l'interaction *en cis* séquestrant les récepteurs inhibiteurs en dehors de la synapse immunologique et permettant donc une réponse NK après engagement des récepteurs activateurs. d. Modèle du rhéostat impliquant une notion de seuil pour la réponse NK.

Un nombre significatif de cellules NK matures chez l'Homme et la souris, *in vivo*, n'expriment pas de récepteur inhibiteur spécifique du CMH de classe I ou expriment seulement des récepteurs qui ne reconnaissent pas ce type de ligand (74, 75). En conséquent, il doit exister d'autres mécanismes mis en œuvre pour prévenir d'une auto-immunité NK.

Dans un modèle murin de souris transgéniques, il a été mis en évidence que, en réponse à une exposition constante aux ligands de NKG2D, les cellules NK NKG2D⁺ vont tolérer les cellules exprimant ces ligands. L'anergie à laquelle ces cellules sont soumises est associée à une diminution de l'expression de NKG2D à la surface des cellules NK et une diminution de la réponse à la signalisation émanant de ce récepteur (76).

Ces différents modèles ont pour point commun de situer l'interaction des récepteurs inhibiteurs avec leur ligand CMH de classe I au centre du processus d'éducation des cellules NK et, de fait, lient la notion de cellules NK éduquée à l'expression des récepteurs inhibiteurs. Cette éducation des cellules NK au travers du CMH de classe I a, sans aucun doute, un rôle important dans le rejet des cellules cancéreuses n'exprimant pas ce CMH, lors du rejet de greffe de moelle osseuse histo-incompatible ou durant certaines infections

induisant une diminution de l'expression du CMH de classe I. Mais il convient de nuancer cette perspective. En effet, le travail de M.T. Orr et al. suggère que cette éducation médiée par le CMH du soi ne conduit pas toujours à une meilleure activation des cellules NK (77). En outre, l'éducation dirigée par les récepteurs inhibiteurs, processus qui promeut la réactivité des cellules NK matures, n'est pas bénéfique dans les situations où le ligand pour ces récepteurs inhibiteurs éducatifs est présent sur les cellules cibles comme le suggère l'équipe de L.L. Lanier.

Il a d'ailleurs été proposé que ces cellules non éduquées puissent être plus efficaces pour éliminer des cibles anormales. Ainsi, il a récemment été démontré que les cellules NK dépourvues de récepteurs inhibiteurs spécifiques du CMH du soi, dites non éduquées, ont un rôle prédominant dans la réponse anti-virale dirigée contre le cytomégalo virus murin (MCMV) (77). On ne peut d'ailleurs réfuter l'hypothèse d'autres récepteurs inhibiteurs dont le ligand est différent des molécules du CMH de classe I.

En conditions basales, les cellules NK n'ayant pas de récepteur inhibiteur doivent probablement être en anergie du fait de la stimulation chronique par les ligands engageant leurs récepteurs activateurs et situés sur les tissus sains. La levée de l'anergie dépend alors de cytokines telles que l'IL-2 (système probablement identique aux LT).

Une étude récente de C. Fauriat et al. propose un rôle des KIRs activateurs dans l'éducation des cellules NK. Ces auteurs ont révélé l'implication de KIR2DS1 et de son ligand HLA-C2 dans l'éducation des cellules NK en induisant une diminution de la réactivité des cellules NK face à des cellules-cibles. En revanche, la stimulation par des cytokines n'entraîne pas de réponse NK (78).

L'éducation et, par conséquent, l'acquisition d'une tolérance au soi des cellules NK constituent un processus dont les mécanismes moléculaires impliqués restent encore mal compris. Cependant, il a été clairement démontré que les interactions entre récepteurs inhibiteurs et molécules de CMH de classe I sont nécessaires à la génération d'une réponse cytotoxique fonctionnelle des cellules NK. Il reste que l'éducation des cellules NK est active, continue et fortement dépendante du microenvironnement. La compréhension de ces mécanismes a, de plus, une grande importance médicale avec, par exemple, une « rééducation » des cellules NK anergiques par des cytokines qui pourrait constituer un nouvel axe d'immunothérapie (79).

E) 2. Mémoire des cellules NK

La mémoire immunologique est considérée comme une caractéristique propre au système immunitaire adaptatif. Il est classiquement décrit que, suivant une exposition à un pathogène donné, les cellules du système immunitaire inné répondent rapidement et de façon non spécifique à l'antigène (Ag). Une nouvelle exposition à ce même pathogène donne lieu à une réponse d'amplitude identique à la précédente. Au contraire, dans le cas de la réponse immunitaire adaptative, une primo-infection provoque une réaction plus tardive,

mais hautement spécifique, des LT et LB du fait de l'expression à leur surface de récepteurs spécifiques de l'Ag générés à partir du réarrangement somatique des gènes codant ces récepteurs. Après élimination de l'agent pathogène, les clones de lymphocytes spécifiques de l'Ag subissent une phase de contraction aboutissant à leur apoptose massive et à la formation d'un petit pool de cellules mémoires à longue durée de vie, capables de répondre de façon plus rapide et plus robuste à une rencontre ultérieure avec un pathogène identique.

La durée de vie des cellules du système immunitaire inné est de l'ordre de quelques heures à quelques jours, en comparaison à celle des LT et LB qui peuvent persister de plusieurs mois à des années. La mise en place d'une mémoire immunitaire dans le cas de ces cellules de courte durée de vie (granulocytes, DC, NK...) est, par conséquent, considérée comme inutile (80).

Bien qu'il n'y ait pas de réarrangement des gènes codant pour les récepteurs activateurs des cellules NK, ces dernières présentent de nombreuses similarités dans leur développement, leur phénotype et leurs fonctions avec les CTL du système immunitaire adaptatif (81). La place des cellules NK, entre le système immunitaire inné et adaptatif, a d'ailleurs récemment fait l'objet de discussions (82, 83).

Il a été mis en évidence, dans des modèles murins, une réponse plus efficace de cellules NK face à un pathogène rencontré antérieurement. L'équipe de U.H. Von Adrian a notamment démontré la mise en place d'une réaction d'hypersensibilité de contact aux haptènes médiée par les cellules NK dans des souris Rag^{-/-} (recombinaison-activating gene), dépourvues de LB et LT (84). Cette réaction persiste plus de 4 semaines et est spécifique de l'haptène auquel les souris ont été exposées auparavant. De façon intéressante, les seules cellules NK de type « mémoire » spécifiques de cet haptène, et permettant de transférer cette sensibilité, résident dans le foie.

L'équipe de L.L. Lanier a également travaillé sur l'hypothèse d'une mémoire NK spécifique d'un virus, avec le modèle du MCMV (Fig. 8) (81). Ils ont ainsi révélé la reconnaissance de cellules infectées par le MCMV exprimant la glycoprotéine virale m157 par les cellules NK porteuses du récepteur Ly49H. Ces cellules NK prolifèrent de façon spécifique en réponse à une stimulation par cet antigène alors qu'un mutant de m157 sera inactif sur les cellules NK Ly49H⁺. Dans un système de transfert adoptif, ces cellules prolifèrent d'un facteur 100 à 1000 dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes d'animaux infectés par le MCMV, formant un pool de cellules NK de type « mémoires » à longue durée de vie. Ces cellules gardent cette capacité d'expansion après plusieurs transferts adoptifs et infections virales. D'après L.L. Lanier ces cellules NK de type « mémoires » gardent la capacité de répondre de façon plus robuste que des cellules NK « naïves » à une infection ultérieure au MCMV durant plusieurs mois.

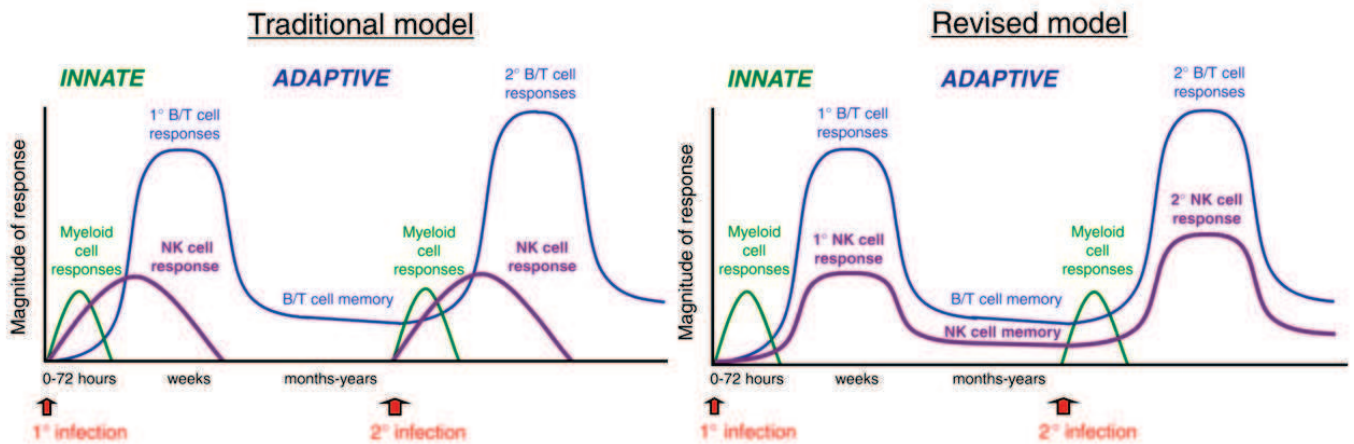


Figure 8: Nouveau modèle de réaction immunitaire à une seconde infection : mémoire des LB/ LT et NK de type « mémoire » (schéma extrait de Sun & Lanier *Eur.JI* 2009).

Certains travaux récents suggèrent également une capacité de cellules NK « type-mémoire » à se remémorer une activation antérieure par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et l'IL-18. Les cellules NK isolées de la rate de souris $Rag^{-/-}$ et pré-activées par l'IL-12 et l'IL-18, une fois injectées dans des souris receveuses $Rag^{-/-}$, prolifèrent *in vivo* et sont détectables jusqu'à 3 semaines après transfert. Ces cellules produisent des quantités plus importantes d'IFN γ en réponse à une nouvelle stimulation par des cytokines (IL-12 + IL-15) ou par le biais de leurs récepteurs activateurs (Ly49H and NK1.1), que des cellules n'ayant pas été pré-activées avant transfert (ou que les cellules NK de l'hôte), mais conservent une fonction cytotoxique similaire (85).

Cette notion de mémoire NK découle des premières observations faites dans des modèles murins et méritent donc d'être approfondie. Quelques rares études suggèrent l'existence de ces cellules NK de type « mémoire » dans l'espèce humaine. En effet, il a été mis en évidence une augmentation de la proportion de cellules NK exprimant à leur membrane l'hétérodimère CD94/NKG2C chez des individus exposés au CMV humain (HCMV) (86). Il est à noter que ces cellules NKG2C⁺ de type mémoire ont été licenciées, elles expriment des KIRs mais plus de NKG2A. De plus, T.W. Kuijpers et al. (87) ont rapporté le cas d'un enfant immunodéficient chez lequel les cellules NK CD94/NKG2C se sont fortement multipliées (88) après infection par le HCMV, mimant l'expansion observée dans le modèle murin. J.C. Sun et al. proposent d'ailleurs la molécule CD57, retrouvée à la surface des LT CD8⁺ matures et d'une petite fraction de cellules NK (considérées comme les plus matures), comme marqueur des cellules NK de type « mémoire » humaines équivalent au KLRG1 définissant les cellules NK de type « mémoire » murines (80).

L'infection au HCMV est considérée comme chronique du fait de la persistance du virus chez son hôte à un niveau faible et asymptomatique. On pourrait donc penser que ce groupe de cellules NK NKG2C⁺ est maintenu par la persistance du virus. Une étude réalisée par N.K. Björkström et al. (89) révèle pourtant l'existence d'une sous-population de cellules

NK de type « mémoire » de même phénotype, CD56^{dim}NKG2C⁺(KIR⁺ et portant en majorité le marqueur CD57), se multipliant et persistant à un niveau relativement élevé pendant au moins 2 mois après une infection virale aiguë à l'hantavirus. Les auteurs ont remarqué que la séropositivité au HCMV était associée à une plus haute fréquence de cellules NK NKG2C⁺ ; séropositivité qui pourrait donc influencer la réponse à l'hantavirus.

Le ligand impliqué dans l'activation et l'expansion de ces cellules NK de type mémoire NKG2C⁺ et le mécanisme inducteur de cette expansion restent cependant encore à découvrir.

F) Les grandes fonctions des cellules NK

Les cellules NK sont connues pour leur capacité à lyser rapidement et sans pré-activation les cellules transformées (certaines cellules tumorales et des cellules infectées par des virus), qui expriment peu ou pas de CMH de classe I à leur surface, au moyen de deux grands mécanismes : la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) et la cytotoxicité dite naturelle. L'interaction de la cellule NK avec sa cellule-cible s'accompagne de la formation d'une structure complexe dénommée synapse immunologique. C'est à ce niveau qu'est déversé le contenu des granules lytiques par un mécanisme d'exocytose dépendant du calcium: la dégranulation.

Une seconde grande fonction des cellules NK, une fois activées, consiste en la production rapide de cytokines et chimiokines telles que l'IFN γ , le TNF α ou le GM-CSF.

Ces lymphocytes de l'immunité innée exerceraient enfin un rôle régulateur sur la fonctionnalité et/ou la maturation de diverses cellules du système immunitaire inné et adaptatif par contacts intercellulaires.

F) 1. Cytotoxicité des cellules NK

Arme commune des CTL et des cellules NK, les granules lytiques sont des lysosomes sécréteurs spécialisés. Une fois la cellule cible identifiée, une synapse immunologique, dépendant notamment de l'interaction entre ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) situé sur la cellule cible et LFA-1 (leukocyte function-associated antigen-1) présent à la surface de la cellule NK, va se former. Le contenu cytotoxique des granules NK est alors déversé de façon polarisée grâce au réseau de microtubules cytoplasmiques. Ces granules contiennent des Granzymes A et B (qui sont des Sérine protéases), des Perforines (protéine perméabilisant la membrane plasmique) et des Granulysines (molécules lytiques anti-microbiennes).

Les perforines polymérisent et forment un pore transmembranaire qui permet aux granzymes de rejoindre le cytosol où ils vont activer les différentes caspases menant à la mort cellulaire par apoptose de la cellule-cible (90). Les perforines sont très importantes dans la suppression des cellules tumorales. De façon intéressante, il a été démontré chez la souris que l'extinction du gène codant la perforine augmente la sensibilité des souris au

développement du fibrosarcome induit par méthylcholanthrène (91). En revanche, une souris déficiente pour un granzyme présente un phénotype normal. Ceci est sans doute lié à la redondance des gènes codant pour les granzymes.

Les deux grands mécanismes qui déclenchent la cytotoxicité ont été largement décrits et développés dans la littérature.

Lors de l'ADCC, les antigènes tumoraux ou de cellules infectées sont recouverts d'anticorps de type Immunoglobuline G (IgG) dont les fragments Fc se lient au récepteur FcγRIIIA, ou CD16, des cellules NK. Les anticorps jouent ici un rôle d'intermédiaire entre la cellule-cible et la cellule effectrice. Leur interaction avec CD16 entraîne la dégranulation des cellules NK, avec exocytose des perforines et granzymes dans la synapse immunologique, et la mort de la cellule-cible. Ce mécanisme est maintenant exploité dans des stratégies d'immunothérapies anti-cancéreuses basées sur les anticorps monoclonaux. L'utilisation d'anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques, surexprimés par les cellules tumorales, est en effet une piste de grand intérêt. Ainsi, des anticorps monoclonaux humanisés, comme le trastuzumab (dirigé contre le récepteur HER2/neu ou ErbB2) et le rituximab (dirigé contre CD20), sont actuellement utilisés pour traiter le cancer du sein et les lymphomes non hodgkinien respectivement.

Les polymorphismes du récepteur CD16 peuvent influencer l'efficacité de ce type de thérapie. En particulier, il a été démontré que la réponse au rituximab est plus efficace chez des patients homozygotes pour l'allotype FcγRIIIA/158V que chez des patients porteurs de l'allèle FcγRIIIA/158F. L'allotype FcγRIIIA/158V confère une meilleure affinité du récepteur pour le rituximab et une ADCC plus efficace *in vitro* (92). Cette ADCC plus efficace serait d'ailleurs liée à une plus forte expression du CD16 à la membrane des cellules NK (93).

La cytotoxicité naturelle des cellules NK fait référence à leur capacité à médier une immunité anti-tumorale ou anti-virale sans sensibilisation au préalable et en absence de reconnaissance des cibles par des anticorps. En 1990, pour expliquer comment les cellules NK sont capables de lyser des cellules-cibles sans atteindre les cellules saines, K. Kärre a proposé l'hypothèse du « soi-manquant » (94). Cette théorie est née à partir de nombreuses observations expérimentales dans lesquelles des cellules tumorales dépourvues de CMH de classe I étaient lysées de façon efficace par les cellules NK, conférant ainsi un rôle des molécules de CMH de classe I dans le contrôle de l'activation des cellules NK. L'hypothèse du « soi-manquant » a, par ailleurs, été émise bien avant la découverte des récepteurs impliqués dans la reconnaissance de ce CMH de classe I (KIRs, CD94/NKG2 et ILTs). L'identification ultérieure des récepteurs inhibiteurs et activateurs des cellules NK a permis de faire évoluer cette théorie. De nos jours, il est communément considéré que l'activation des cellules NK dépend d'une balance intrinsèque entre les signaux activateurs et inhibiteurs provenant des différents récepteurs exprimés à la surface des cellules NK (Fig. 9).

Il est à noter qu'un manque de signal inhibiteur n'est pas suffisant en soi pour déclencher une activation des cellules NK, il faut aussi un signal activateur conséquent. Ceci permet

d'expliquer pourquoi des cellules ayant de grandes quantités de CMH de classe I à leur surface peuvent aussi être la cible des cellules NK (95).

Le sous-type de cellules NK décrit comme effecteur cytotoxique majoritaire correspond aux cellules $CD3^-CD56^{dim}$ bien que l'on puisse observer une activité cytotoxique des cellules NK $CD56^{bright}$ après stimulation *in vitro* avec de l'IL-2 (96).

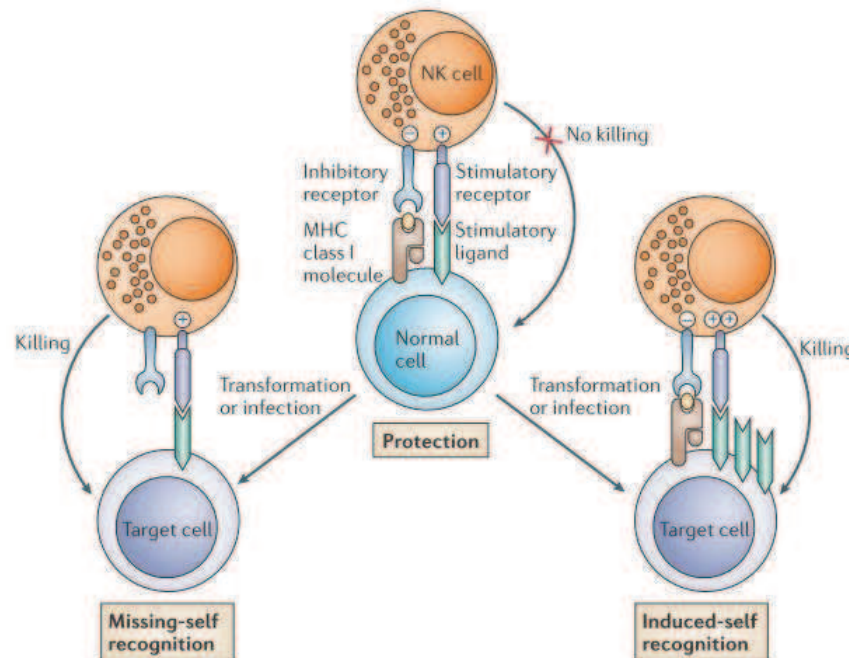


Figure 9 : Balance entre signaux activateurs et inhibiteurs déterminant l'induction ou l'inhibition de la cytotoxicité NK (Schéma extrait de Raulet D.H. & R.E Vance, *Nature Rev.*, 2006).

La capacité cytolytique des cellules NK est désormais classiquement évaluée par le biais de l'externalisation du marqueur CD107a à la membrane (Fig.10) (97). Le CD107a (ou LAMP-1 pour « Lysosomal-Associated Membrane Protein-1 »), est un marqueur de dégranulation exprimé à la surface des granules cytotoxiques et associé aux granules d'exocytose (97-101). A l'origine, le marquage CD107a a été utilisé par M.R. Betts et al. pour identifier et isoler les CTL viables selon la mobilisation du CD107a à la surface de ces cellules (100). Par la suite, le test a été mis au point *ex vivo* en cancérologie (102) et enfin la technique a été adaptée aux cellules NK (103).

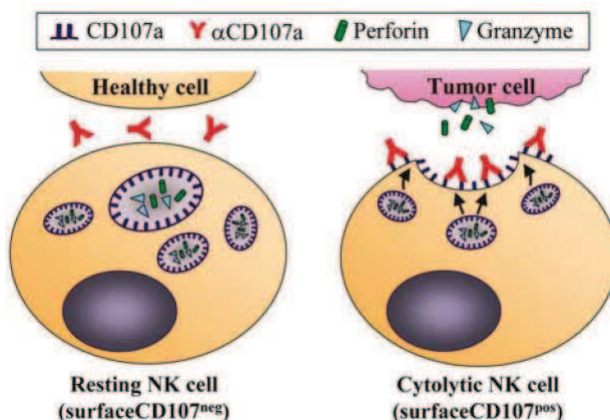


Figure 10 : Visualisation de la capacité cytotoxique des cellules NK au moyen de la mobilisation du CD107a à la membrane plasmique (schéma extrait de : Uhrberg M., *Leukemia*, 2005).

Des mécanismes alternatifs peuvent être utilisés par les cellules NK pour induire la mort de leurs cibles. Ils dépendent de molécules de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor) telles que le $\text{TNF}\alpha$, Trail (TNF-related apoptosis-inducing Ligand) et FASL (FAS ligand) (104), produites par les cellules NK, et de leurs récepteurs exprimés par les cellules-cibles (TNF-R, TRAIL-R et FAS). Ces mécanismes sont moins impliqués dans l'immunité dirigée contre les pathogènes *in vivo* mais se révèlent importants dans l'élimination des cellules lymphoïdes auto-réactives et dans l'homéostasie. Il a, par exemple, été récemment mis en évidence que les cellules NK pouvaient éliminer les cellules trop inflammatoires, telles que les neutrophiles, dans le but de contrôler l'intensité de la réponse immunitaire après activation du récepteur Nkp46 (105). Fas (ou CD95) est exprimé par un grand nombre de cellules et comporte un domaine de mort (ou « Death Domain », DD) dans sa portion intra-cytoplasmique qui, après interaction avec FasL, active de façon indirecte le clivage des caspases et induit l'apoptose de la cellule exprimant FAS. L'activation de deux autres membres de cette famille : DR4 (ou TRAIL-R1) et DR5 (TRAIL-R2) par leur ligand TRAIL, conduit également à un signal apoptotique.

F) 2. Fonction de sécrétion des cellules NK.

Selon les stimulations environnementales, par le biais de leur récepteurs NK, de récepteurs « Toll-like » (TLRs), ou de monokines (comme l'IL-2 ou l'IL-15...), les cellules NK peuvent produire rapidement des cytokines telles que l'interferon γ ($\text{IFN}\gamma$) et le Tumor Necrosis Factor α ($\text{TNF}\alpha$), des facteurs de croissance comme le Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor (GM-CSF) ou encore des chimiokines comme les Macrophage Inflammatory Proteins 1 (MIP-1) α et β , RANTES ou l'IL-8, conduisant au recrutement et à l'activation des macrophages et des DC et participant à l'orientation de la réponse immunitaire adaptative.

L'IFN γ est la cytokine la plus abondamment produite par les cellules NK. Elle influence aussi bien la réponse immunitaire innée, en activant les macrophages (phagocytose) et la maturation des DC pro-inflammatoires, que la réponse immunitaire adaptative en favorisant la polarisation des LT CD4^+ vers la voie Th1 (106). Cette cytokine joue un rôle crucial dans la réponse immunitaire contre les virus ou les bactéries ainsi que dans la défense anti-tumorale (107).

Les cellules NK sécrètent également du $\text{TNF}\alpha$ et de la lymphotoxine α ($\text{LT}\alpha$), cytokines intervenant dans la formation de centres germinatifs dans les OLS tels que la rate et les ganglions (108). Ces centres germinatifs représentent les lieux de production des anticorps « secondaires » de haute affinité. Le rôle également cytotoxique du $\text{TNF}\alpha$ a été discuté ci-dessus.

Le GM-CSF est un facteur de croissance important sécrété par les cellules NK (109), influençant la maturation des DC tolérogènes et qui peut donc indirectement avoir une

répercussion sur la formation de LT régulateurs (LTreg). Le GM-CSF est aussi un facteur de croissance essentiel pour les polynucléaires neutrophiles.

L'IL-10 est une cytokine produite tardivement lors de l'activation des cellules NK. Elle joue un rôle anti-inflammatoire primordial dans le contrôle de l'intensité et de la durée de la réponse immunitaire (110).

Les cellules NK produisent aussi de l'IL-1 β , du TGF β 1, de l'IL-5, de l'IL-8 et de l'IL-13, du G-CSF, RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β participant à l'attraction de différents types cellulaires sur les sites d'inflammation et à la génération d'une réponse immunitaire spécifique d'antigène (111-114). Récemment, les cellules dites NK-22, sous-type de cellules NK humaines retrouvées dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses et spécialisées dans la production d'IL-22 en réponse à l'IL-23, ont été révélées par l'équipe de M. Colonna (115).

La source principale de ces cytokines et chimiokines correspond au sous-type de cellules NK CD56^{bright}, bien que les cellules CD56^{dim} puissent aussi en produire en plus petites quantités (114). R.R. Trotta et al. expliquent d'ailleurs cette production de cytokines plus importante dans les cellules CD56^{bright} par la présence d'une plus grande quantité de la phosphatase SHIP-1 dans ces cellules. SHIP-1 est, en outre, un régulateur de l'expression *in vitro* et *in vivo* de l'IFN γ (116).

De façon générale, il a été suggéré que les cellules CD56^{bright} ont besoin de deux signaux pour produire de l'IFN γ , dont l'un est l'IL-12, le second pouvant être une autre cytokine telle que l'IL-1, l'IL-2, l'IL-15 ou l'IL-18 ou encore l'engagement de récepteurs activateurs des cellules NK comme CD16 ou NKG2D (117).

F) 3. Prolifération des cellules NK

A la différence des LB et des LT, les cellules NK ne prolifèrent pas de façon soutenue en réponse à un stimulus *in vitro*, mais elles n'ont pas non plus besoin d'un co-stimulus en plus de l'IL-2 ou de l'IL-15 pour rapidement proliférer. Tout comme pour les fonctions de cytotoxicité et de sécrétion de cytokines, les deux sous-types de cellules NK CD56^{dim} et CD56^{bright} se distinguent dans leurs capacités de prolifération. Alors que les cellules CD56^{bright} peuvent se multiplier en réponse à une stimulation avec de faibles doses d'IL-2, de l'ordre du picomolaire (pM), les cellules CD56^{dim} prolifèrent peu, même en présence de fortes concentrations en IL-2 (nM). Une des explications de cette différence observée entre les deux sous-types de cellules NK provient du fait que les cellules CD56^{bright} expriment de façon constitutive le récepteur de haute affinité à l'IL-2, IL-2R $\alpha\beta\gamma$, leur permettant de proliférer dix fois plus que les cellules CD56^{dim} qui ne possèdent que le récepteur d'affinité intermédiaire, IL-2R $\alpha\beta$. L'IL-2 induit plutôt une augmentation de l'activité cytotoxique des cellules CD56^{dim}. L'IL-15 à forte dose (nM) peut aussi induire la prolifération des cellules NK CD56^{bright} *in vitro*, par le biais du récepteur IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ (118).

L'IL-2 ou l'IL-15, à eux-seuls, sont capables d'induire une prolifération des cellules NK, mais leur effet peut être augmenté par l'ajout d'autres cytokines ou stimuli (119). A de faibles concentrations, entre 0,5 et 5 ng/ml, l'IL-10 augmente aussi de façon significative la prolifération des CD56^{bright} induite par le récepteur à l'IL-2 de haute affinité (120).

Différentes méthodes ont été développées pour induire ou améliorer la différenciation et/ou la prolifération des cellules NK dans le but d'évaluer le rôle de ces cellules activées et multipliées *in vitro* dans le cadre de thérapies anti-cancéreuses. L'équipe de D. Campana a d'ailleurs démontré en 2009 que des cellules NK pouvaient être obtenues en grand nombre (expansion x21,6) à partir d'une co-culture de 7 jours de cellules mononucléées du sang en présence de la lignée cellulaire K562 (lignée leucémique, cible classique des cellules NK) irradiée et génétiquement modifiée pour exprimer la forme membranaire de l'IL-15 et le ligand de 4-1BB/TNFSF9 (121). Dans ces conditions, la multiplication des cellules NK est supérieure à celle obtenue après culture en présence d'IL-2, d'IL-15, d'IL-12 et/ou d'IL-21 et se fait sans différenciation en LT. Ces cellules NK ont aussi acquis, par ce moyen, une capacité cytotoxique plus importante. Par ailleurs, un système d'activation *in vitro* avec des anticorps pré-fixés et dirigés contre NKp46 et CD2 a été développé par Miltenyi Biotec (Auburn CA) et engendre une expansion d'un facteur 100 des cellules NK en 21 jours. Un autre moyen permettant d'induire une prolifération rapide et conséquente des cellules NK (x 21 000) consiste à les cultiver *in vitro* pendant 21 jours en présence de cellules K562 présentant de l'IL-21 membranaire (122). Chez la souris, la délétion de Bcl11b (facteur de transcription spécifique des LT) dans des thymocytes précurseurs (en phase de réarrangement du TCR), permet d'obtenir des cellules « NK-like » génétiquement reprogrammées. Ces cellules ITNK (induced-T to NK) ont un phénotype et une fonction semblable à ceux des cellules NK conventionnelles. Les cellules ITNK sont aussi caractérisées par une forte capacité proliférative après stimulation par de l'IL-2 : x 500 000 (64). Ces cellules « NK-like » ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques. Néanmoins, l'utilisation de cellules reprogrammées génétiquement soulève la question de leur innocuité dans le cas d'injection chez l'Homme et nécessite donc de plus amples investigations.

F) 4. NK régulatrices et régulation de la fonction NK

Au-delà de leur fonction effectrice anti-tumorale et anti-virale, les cellules NK jouent un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire en interagissant de façon directe ou indirecte avec les cellules environnantes, en particulier les cellules myéloïdes et les LT.

Interactions NK/DC myéloïdes (mDC)

Les cellules NK activées (par l'IL-2 par exemple) peuvent influencer la maturation des DC immatures (iDC) autologues ou décider de leur mort cellulaire par apoptose (fonction d'« édition des DC »). L'interaction NK/DC met en jeu le récepteur activateur NKp30 et son ligand situé à la membrane des DC (123, 124). Il s'ensuit alors une production de TNF α et

d'IFN γ par les cellules NK donnant lieu à la maturation des iDC (Fig. 11A). La rencontre NK/DC a lieu dans les sites d'inflammation et au sein des ganglions lymphatiques où ces cellules sont recrutées par des chimiokines relarguées dans les phases précoces de l'inflammation. Il est à noter que la maturation des iDC induite par les cellules NK par le biais de NKp30 doit aussi dépendre des récepteurs inhibiteurs spécifiques du CMH de classe I. En effet, les cellules NK expriment différentes combinaisons de récepteurs activateurs et inhibiteurs et, par conséquent, la capacité d'activation de ces dernières, est proportionnelle au degré d'inhibition reçu par ces récepteurs inhibiteurs face au signal activateur.

Le récepteur NKp30 joue également un rôle majeur dans la lyse des iDC (Fig. 11B) (125). Mais d'autres récepteurs sont mis en jeu à ce niveau. L'analyse des clones NK capables d'induire la mort cellulaire des iDC par M. Della Chiesa et al. (126) révèle l'existence d'un sous-type de cellules NK dépourvues de KIRs mais exprimant CD94/NKG2A. Par la suite, il a été mis en évidence que DNAM-1, co-récepteur activateur retrouvé à la surface de la plupart des cellules NK et des LT, et dont les ligands sont la nectin-2 et PVR (récepteur au poliovirus), coopère avec NKp30 dans la lyse des iDC (127). Cette capacité des cellules NK à lyser les iDC par le biais de NKp30 pourrait conduire à affaiblir la réponse des DC et/ou à limiter le « priming » des LT (124, 128). Ceci pourrait avoir une grande importance durant les phases précoces de la réponse inflammatoire.

L'origine du signal d'une réponse immunitaire semble être au niveau des DC, même si les cellules NK ont la capacité d'activer et d'éliminer ces DC. En effet, comme les LT, les cellules NK nécessitent un amorçage ou « priming » pour être totalement fonctionnelles. L'IL-15, sécrétée notamment par les DC, serait suffisante *in vitro* et nécessaire *in vivo* pour permettre le « priming » des cellules NK (129). De plus, la transprésentation d'IL-15 par les DC au IL-15R α des cellules NK stimule *in vitro* leur activité cytotoxique et leur production d'IFN γ (130). Les DC produisent par ailleurs d'autres cytokines, telles que l'IL-1, l'IL12 ou l'IL-18, jouant sur l'activation et la fonction des cellules NK (Fig.11C).

Le TGF- β (Transforming Growth Factor- β), cytokine immunosuppressive produite sous certaines conditions par les DC ou les cellules tumorales, entraîne une diminution de l'expression de NKp30 et NKG2D à la surface des cellules NK (131). Ceci pourrait expliquer la diminution de l'expression de NKp30 à la surface des cellules NK et la résistance des iDC à la lyse par les NK, observées chez des patients souffrant de leucémie aigüe myéloblastique (LAM) (132, 133).

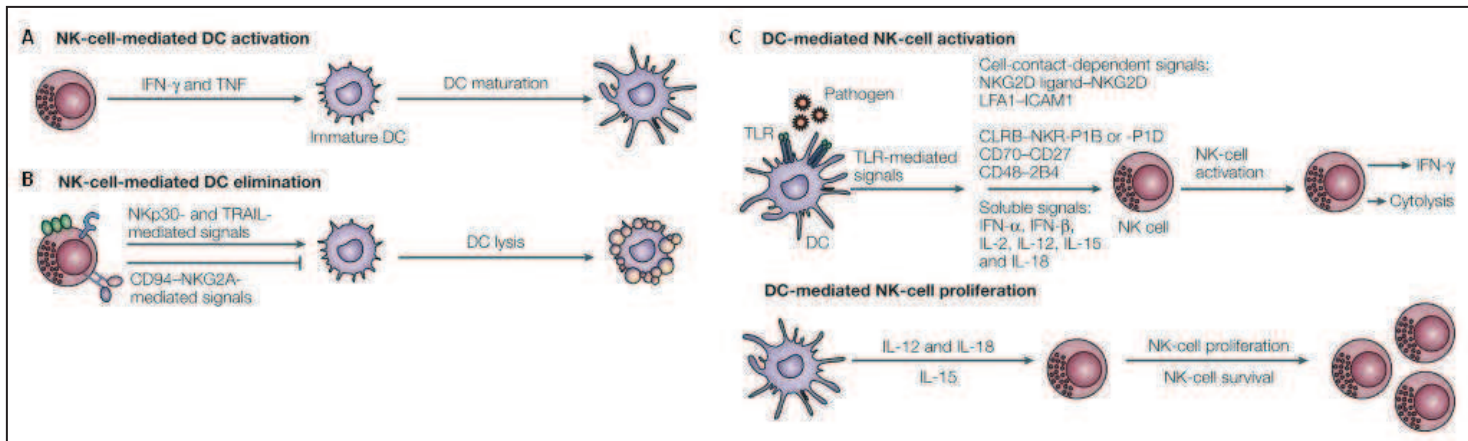


Figure 11 : Régulation mutuelle entre cellules NK et DC. A. Les cellules NK activées influencent la maturation des iDC en produisant de l'IFN γ et du TNF α . B. Lors d'une mauvaise maturation des iDC les cellules NK vont induire leur mort cellulaire par apoptose par le biais de NKp30. C. Les DC matures peuvent jouer sur l'activation des cellules NK au travers des cytokines pro-inflammatoires qu'elles produisent (Schéma extrait de Degli-Esposti M.A., & M.J. Smyth, *Nat.Rev.Immunol.*, 2005).

Les interactions entre cellules NK et DC, selon le site où elles se rencontrent et leur état de maturation, ont ainsi plusieurs conséquences :

- le priming des NK naïves (avec expression du CD69, accumulation de granzyme B dans les granules cytotoxiques, mais pas de production d'IFN γ),
- la maturation des iDC,
- l'activation mutuelle DC matures/ NK fonctionnelles.

Interactions NK/DC plasmacytoïdes (pDC)

Les cellules NK peuvent aussi établir des contacts cellulaires avec les pDC mais elles sont incapables de tuer ces dernières, probablement du fait de l'expression en grande quantité du CMH de classe I, et en particulier du HLA-E, à leur surface (124). Les pDC stimulées par le biais de TLR9 peuvent promouvoir la prolifération des cellules NK CD56^{bright} (134). Elles peuvent, de plus, induire l'expression du marqueur d'activation CD69 à la surface des cellules NK et l'augmentation de la réponse cytotoxique.

Interactions NK/macrophages

Les cellules NK interagissent avec un autre type de cellules myéloïdes, les macrophages, par l'intermédiaire du co-récepteur NK: le 2B4. Cette interrelation avec les macrophages active la prolifération et la production d'IFN γ par les cellules NK. Les cellules NK, quant à elles, peuvent lyser les macrophages, qui ont été stimulés par de fortes doses de lipopolysaccharide (LPS), de façon dépendante de NKG2D (135). Ceci révèle d'ailleurs un rôle important des cellules NK dans la suppression des macrophages trop stimulés et donc dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.

Les cellules NK peuvent donc avoir un rôle d'intermédiaire entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif à l'instar des DC. Certaines équipes vont même jusqu'à soumettre l'idée d'une sous-population de cellules NK régulatrices qui pourraient être générées à partir de cellules CD34⁺ provenant du sang périphérique au moyen de l'IL-15 membranaire (136).

La coopération NK/T

Les OLS, tels que les ganglions lymphatiques, sont des lieux clés où sont initiées les réponses immunitaires adaptatives. Ce sont aussi des sites d'interaction entre cellules NK et DC pouvant aboutir à la sécrétion d'IFN γ par les cellules NK. L'IFN γ produit va alors faciliter la polarisation des LT vers le profil Th1 (106). Les cellules NK peuvent aussi interagir directement avec les T CD4⁺ grâce à la liaison de OX40 avec son ligand OX40L (137). Cette interaction NK/T est d'ailleurs à double sens: F. Bihl et al. ont émis l'hypothèse selon laquelle les LT CD4⁺ seraient essentiels, au moment de l'initiation de l'activation des cellules NK dans les ganglions lymphatiques, dans le cadre d'une infection à *Leishmania Major* chez la souris (138, 139). Les cellules NK participeraient aussi au priming des CTL.

Importance du microenvironnement cellulaire

L'intensité et la qualité des réponses NK dépend du microenvironnement cytokinique et des interactions avec les autres cellules du système immunitaire comme les LT, les macrophages ou les DC (140).

Les cellules NK expriment les TLR3 et TLR9 (141) et peuvent donc être activées en présence des ligands viraux et bactériens de ces récepteurs (ARN double brin et ADN CpG respectivement). Cette activation se traduit par une réponse fonctionnelle NK classique (sécrétion de cytokines et cytotoxicité).

L'IL-2 est, comme cela a été discuté précédemment, une cytokine majeure dans l'activation des lymphocytes NK qui expriment de façon constitutive un récepteur à l'IL-2 fonctionnel. En plus de son aptitude à induire la production de cytokines par les cellules NK, l'IL-2 joue sur leur capacité cytotoxique et proliférative. L'exposition des cellules NK à des concentrations saturantes en IL-2 stimule une activité LAK (Lymphokine-Activated Killer) envers les cellules tumorales qui, autrement, résistent à la lyse médiée par les cellules NK (142). Dans le cadre de l'activité LAK, l'IL-2 augmente l'expression de la perforine. L'IL-15 peut également avoir un effet amplificateur de la cytolyse des cellules-cibles qui pourraient être plus résistantes (118). IL-2 et IL-15 sont ainsi impliquées tout au long de la vie des cellules NK, de leur développement à leur homéostasie, en passant par leur activation, leur activité cytotoxique et leur production de cytokines (143).

La fonction NK peut par ailleurs être fortement influencée par la présence dans le microenvironnement de cytokines polarisantes telles que l'IL-12 ou l'IL-4. Ainsi, les cytokines comme l'IL-12, les IFN de type I, l'IL-15 et l'IL-18 (produites par les macrophages et/ou les

DC) sont des molécules activatrices de la fonction NK (144) alors que l'IL-4 (produite notamment par les basophiles) diminue la réponse cytolytique et sécrétoire (124).

Selon la combinaison de cytokines sécrétées à proximité des cellules NK, la production d'un type de cytokine ou d'un autre par ces dernières est favorisée. La présence simultanée d'IL-12 et d'IL-18 représente la situation optimale pour produire de l'IFN γ . La combinaison IL-15/IL-18, quant à elle, favorise la production de GM-CSF par les cellules NK tandis que celle de l'IL-12 avec l'IL-15 les oriente vers une sécrétion d'IL-10, de MIP-1 α et β et de TNF α . La quantité et la qualité des cytokines produites en réponse à une infection doit probablement être un facteur déterminant dans la réponse cytokinique des cellules NK CD56^{bright} (114, 145).

G) Cellules NK et immunophysiopathologie

G) 1. Cellules NK et cancers

Les cellules NK ont été identifiées et caractérisées, pour la première fois, dans les années 1970, du fait de leur capacité à lyser des cellules tumorales établies en lignées *in vitro* (1, 2, 140). Certaines lignées tumorales se sont d'ailleurs avérées particulièrement sensibles à la lyse NK (146). Par la suite, grâce à des modèles expérimentaux de tumeurs transplantées, induites par méthylcholanthrène ou spontanées dans des souris transgéniques, il a été mis en évidence que les cellules NK jouaient aussi un rôle important dans le contrôle de l'initiation, du développement et de la dissémination des tumeurs *in vivo* (147-150).

Chez l'Homme, les interactions cellules NK/cellules tumorales *in vivo* sont moins bien caractérisées. Cependant, différents arguments indiquent que les cellules NK exercent un rôle important dans le contrôle du développement des tumeurs. Les premières données suggérant que les cellules NK humaines ciblent des tumeurs *in vivo* découlent d'observations faites lors de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (TCSH) dans le traitement de patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique (LAM). La première population lymphocytaire à se rétablir après TCSH est en effet celle des cellules NK. Les cellules NK allo-réactives du donneur (montrant une incompatibilité au niveau des récepteurs inhibiteurs spécifiques du HLA ou KIRs) participent à l'effet « Greffe versus Leucémie » (GvL) et corréleront donc avec une meilleure survie des patients ainsi traités (151, 152). Le rétablissement rapide de la population NK après TCSH semble influencer de façon favorable le devenir clinique des patients leucémiques (LAM). De plus, le nombre de cellules NK, 30 jours après la greffe, apparaît comme un élément unique, indépendant et déterminant dans l'avenir de la transplantation (153).

La remarquable étude de K. Imai, avec un suivi sur 11 ans de plus de 3600 individus, a par ailleurs démontré qu'une forte activité NK est corrélée à un risque plus faible de développer un cancer (154). De plus, dans certains cancers, la présence de cellules NK est un facteur pronostique favorable (155-158).

Les cellules NK peuvent reconnaître des cellules tumorales d'origines diverses : LAM, myélome multiple, neuroblastome, cancer gastrique, carcinome des cellules rénales, du côlon, des ovaires, etc ... Différents récepteurs des cellules NK (NKR) ont été impliqués dans la détection et la lyse des tumeurs. Il s'agit des récepteurs activateurs des cellules NK: NKG2D, NCRs, CD16 et DNAM-1, ainsi que des récepteurs inhibiteurs: NKG2A et KIRs. L'analyse de l'expression de ligands sur les tumeurs devrait aider à prédire la sensibilité de ces cellules tumorales à la lyse NK. Il est donc important de prendre en compte le phénotype des cellules cibles et effectrices, car elles sont toutes les deux essentielles dans le devenir de l'interaction NK/tumeur.

Les plus grands défauts phénotypiques et fonctionnels des cellules NK ont été observés chez des patients leucémiques. En effet, dans la Leucémie Myéloïde Chronique, le nombre de cellules NK, leur prolifération et leur capacité cytotoxique sont diminués (159). Chez les patients atteints de LAM, une fonction NK détériorée a, en outre, été associée à une rechute précoce (160). Le rôle majeur des cellules NK dans le contrôle des LAM ayant été démontré antérieurement avec la TCSH, R.T. Costello et al. ont ensuite mis en évidence une forte déficience en NCRs NKp30 et NKp46, phénotype qualifié de « NCR^{dull} », corrélée à une cytotoxicité réduite que ce soit dans un système autologue ou allogénique (132). Ce défaut phénotypique est également corrélé à une plus faible élimination des iDC, ce qui doit probablement mener à une tolérance des cellules T médiée par ces iDC (133). Le contact direct entre cellules leucémiques et cellules NK serait responsable de la diminution de l'expression des NCRs observée chez les patients LAM. Le phénotype NCR^{dull} observé est réversible *in vitro* chez les patients en rémission complète, comparés aux patients en rémission partielle ou en rechute. C. Fauriat et al. ont d'ailleurs mis en évidence une corrélation entre le phénotype NCR^{dull} et une moins bonne survie des patients atteints de LAM. Ce phénotype NCR^{dull} peut donc être considéré comme un marqueur pronostique dans la survie des patients (161).

Une altération des cellules NK est aussi détectée dans les tumeurs solides même si leurs phénotypes et leurs fonctions sont souvent affectés de façon moins marquée que dans les leucémies. Les cellules NK de patients atteints de mélanome métastatique ont une activité cytolytique diminuée sur les cellules-cibles K562 *in vitro* et une expression moindre des récepteurs NKG2D et CD161 (NKR-P1A ou KLRB1) (162). Les sous-populations NK CD16^{dim} et CD16^{low} sont augmentées dans le sang périphérique de ces patients et par conséquent le sous-type CD16^{bright} se retrouve diminué (163, 164). Les cellules NK de patients porteurs de mélanomes au stade IV ont également une expression des récepteurs CD16, NKp30 et NKp46 réduite (165). G. Pietra et al. ont d'ailleurs récemment émis l'hypothèse selon laquelle le mélanome induirait une inhibition de l'expression des récepteurs activateurs NKp30, NKp44 et NKG2D à la surface des cellules NK (166). Au contraire, une corrélation positive entre le nombre de cellules NK infiltrant les lésions mélanocytaires et leur régression a récemment été rapportée par K. McKay et al. (167).

Dans le cancer du sein, des études récentes ont décrit des altérations du phénotype et de la fonction des cellules NK du sang périphérique chez les patients ayant une tumeur invasive. Les niveaux d'expression des récepteurs NKp30, NKG2D, DNAM-1 et 2B4 diminuent progressivement lors du développement de la tumeur alors que celui de NKG2A, récepteur inhibiteur, augmente. Ces altérations phénotypiques corrèlent avec des défauts fonctionnels de la cytotoxicité et de la production d'IFN γ et de TNF α par ces cellules NK (168). Les patientes ayant développé un cancer du col de l'utérus présentent aussi un pourcentage plus faible de cellules NK et une diminution de l'expression de NKp30, NKp46 et NKG2D (169). Dans le carcinome rénal métastatique, les cellules NK ont un phénotype et une fonction similaire à celle de donneurs sains. Cependant, A. Gati et al. ont démontré que la réponse proliférative de ces cellules NK, induite par une stimulation cytokinique, est altérée (170). Dans le cancer de la prostate, un nombre élevé de cellules NK a été associé à un risque plus faible de progression tumorale (171).

Différentes stratégies thérapeutiques ont été développées ou sont en cours de développement pour exploiter l'activité lytique anti-tumorale des cellules NK (149, 172). Elles consistent à :

- Activer les cellules NK endogènes par des cytokines pro-inflammatoires.

Il a par exemple été administré de l'IL-2 recombinante humaine à forte dose pour traiter des patients atteints de mélanome métastatique ou de carcinome rénal. Une réponse durable a par ailleurs été obtenue dans 15-20% des cas avec parfois une rémission complète (173). Des essais cliniques du même type ont été réalisés chez des patients atteints de LAM et étaient aussi concluants (174). Cependant, une toxicité non négligeable a été mise en évidence et l'efficacité de ce traitement reste faible.

- Injecter/Introduire des cellules NK allogéniques (de donneurs). Leur efficacité a été démontrée dans le cadre des TCSH pour traiter les patients avec LAM où on obtient un meilleur contrôle de la leucémie, une diminution du taux de rechute, une augmentation de la survie sans maladie et une protection de la maladie du greffon contre l'hôte (175). Des essais de transferts adoptifs de cellules NK allogéniques pré-activées avec de l'IL-2 chez des patients cancéreux se sont également révélés efficaces et sans danger (176). Cependant ce système se heurte à la limite de la durée de vie des cellules NK. Il est donc nécessaire de mettre au point des protocoles pour accroître la survie et l'expansion des cellules NK *in vivo* (177, 178).

- Traiter avec des anticorps monoclonaux bloquant les KIRs (anti-KIRs monoclonaux). 1-7F9 est le premier anticorps monoclonal anti-KIRs totalement humain qui interagit avec les récepteurs inhibiteurs KIR2DL1, KIR2DL2 et KIR2DL3. Une étude pré-clinique avec cet anticorps a donné des résultats très encourageants, avec un blocage spécifique et stable des KIRs ciblés et une amélioration de la lyse *in vitro* et *in vivo* des blastes LAM (179).

- Traiter avec des anticorps monoclonaux dirigés contre des structures tumorales et permettant d'induire une puissante ADCC. Le rituximab, par exemple, anticorps spécifique

dirigé contre le CD20 des LB, est utilisé dans le traitement du lymphome non Hodgkinien (180).

Le rôle des cellules NK dans l'immunosurveillance des tumeurs est de mieux en mieux documenté même si les mécanismes d'échappement tumoral à ces effecteurs restent encore mal compris.

G) 2. Cellules NK dans l'immunité anti-infectieuse

Un autre domaine dans lequel les cellules NK jouent un rôle important est la défense de l'hôte contre les micro-organismes pathogènes, qu'ils soient d'origine virale, bactérienne ou parasitaire (181). Le but ici n'est pas de dresser une liste exhaustive de toutes les pathologies infectieuses dans lesquelles les cellules NK ont été impliquées, mais de présenter brièvement quelques exemples parmi les mieux documentés.

NK et virus

Le rôle des cellules NK dans la lutte contre les infections virales est particulièrement bien établi. En effet, peu après que les cellules NK ont été identifiées du fait de leur capacité à lyser des cellules tumorales, il a été rapporté que les cellules NK activées pouvaient aussi détecter des cellules infectées par des virus (65). L'implication des cellules NK dans l'immunité anti-virale a vraisemblablement été démontrée pour la première fois à partir des observations faites dans un modèle d'infection par le cytomegalovirus murin (MCMV), virus de la famille des herpès virus (182). Le récepteur activateur des cellules NK, Ly49H, fixe la glycoprotéine virale m157 et représente par conséquent un facteur important dans la reconnaissance du MCMV (183, 184). Les cellules NK permettent ainsi de contrôler l'infection en collaboration avec les LT CD4⁺ et CD8⁺.

Le contrôle du CMV par les cellules NK est aussi important dans l'espèce humaine. Ainsi, un patient dépourvu de cellules NK, mais ayant toujours des LT et LB, est décédé des suites d'une infection par le HCMV (185). Cependant, un quelconque rôle des KIRs, équivalent des récepteurs Ly49 de la souris, n'a pas été mis en évidence. Le rôle des complexes CD94/NKG2A et CD94/NKG2C qui interviennent probablement dans la réponse immunitaire dirigée contre le HCMV reste donc à préciser.

Le CMV, de son côté, a développé des mécanismes d'échappement à la lyse par les cellules NK. La production de protéines comme gp40 par le CMV permet en effet de prévenir l'externalisation de molécules « de stress/de danger », telles que MICA/MICB, provoquant un signal activateur en se fixant au récepteur NKG2D (186) ou UL16, empêchant l'expression d'autres ligands de NKG2D : ULBP1 et ULBP2 (187, 188). Le HCMV produit aussi la protéine pp65 qui interagit avec le récepteur activateur NKp30, et le dissocie de sa protéine adaptatrice CD3ζ. La signalisation est bloquée et les cellules NK restent inactivées (189).

Dès le milieu des années 1980, G. Poli et al. décrivent un autre type de modification des cellules NK dans le cadre d'une infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH-

1) (190). Par la suite, ce type d'infection a été associé à des changements significatifs dans la distribution et la fonction des cellules NK du sang périphérique (191). D'une part, une dramatique diminution de la proportion des cellules NK $CD3^+CD56^+$ et plus particulièrement des $CD56^{bright}CD16^-$ est observée chez les patients séropositifs (192, 193). D. Mavilio et al. ont d'ailleurs émis l'hypothèse selon laquelle cette réduction en cellules NK traditionnelles serait liée à l'émergence d'une population NK rare chez les individus sains: $CD3^+CD56^+CD16^+$ (10). D'autre part, il a été démontré que la détérioration de la fonction cytotoxique des cellules NK, lors d'une infection par le VIH-1, est corrélée à une réduction de l'expression des NCRs (194). En effet, l'expression de NKp30 et NKp46 à la surface des cellules NK diminue de façon parallèle à la virémie pour devenir inexistante (phénotype NCR^{dull}) de façon concomitante à une augmentation de l'expression des KIRs (195). Les cellules NK du sang périphérique d'individus infectés par le VIH-1 perdent également l'expression de certains marqueurs associés aux NK activées, comme CD25 ou NKp44, alors qu'elles peuvent toujours exposer CD69 ou HLA-DR à leurs membranes (196). Ceci suggère qu'elles sont activées de façon incomplète, leur stimulation chronique entraînant probablement un épuisement cellulaire et une anergie.

Ainsi, les données disponibles suggèrent un rôle important des cellules NK dans le contrôle de l'infection au VIH, mais les mécanismes par lesquels ces cellules exercent leur activité anti-virale, ainsi que les causes de leur dysfonctionnement, restent mal compris.

Les cellules NK sont aussi impliquées à différents stades de l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) avec un rôle à la fois direct, en ciblant les hépatocytes, et indirect, en influençant d'autres cellules immunitaires comme les DC ou les LT. Pendant la phase aiguë de l'infection, la sous-population $CD56^{bright}$ des cellules NK est augmentée et, en conséquence, les $CD56^{dim}$ sont diminuées. Dans le cas d'une élimination spontanée du virus, les nombres des deux grands sous-types de cellules NK reviennent à un niveau comparable à ceux observés chez les sujets sains (197). Durant cette phase, l'expression de NKG2D et les fonctions de production d'IFN γ et de cytotoxicité sont également augmentées. Au pic de la fonction NK, leur coopération avec les LT permet l'élimination du virus. Dans le cas d'infection chronique au VHC, et donc d'une difficulté à éliminer le virus, la fréquence des cellules NK du sang périphérique diminue. Leur niveau est rétabli par une thérapie anti-virale efficace (198). Tout comme le CMV, le VHC développe des mécanismes d'échappement à la reconnaissance par le récepteur activateur NKG2D au travers de l'induction d'une diminution de l'expression de ses ligands (199).

Les cellules NK jouent vraisemblablement un rôle dans d'autres infections virales. Ainsi, il a été montré que l'hémagglutinine (HA) des poxvirus se fixe aux NCRs (200). Une infection létale par le virus de la grippe a en outre été associée à une absence d'expression du récepteur NKp46 à la surface des cellules NK (201). D'après M. Jarahian et al., l'HA qui module l'expression de NKp30 et NKp46 représenterait un ligand conservé des NCRs. Cela pourrait constituer un nouveau mécanisme d'échappement viral en bloquant l'activation des NK par NKp30 aux stades tardifs de l'infection (202).

NK et autres micro-organismes pathogènes

Bien que les cellules NK aient été le mieux étudiées dans les réponses anti-tumorale et anti-virale, elles suscitent un intérêt croissant dans la lutte contre certains micro-organismes comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Cryptococcus neoformans* ou *Plasmodium falciparum*, où elles pourraient avoir un rôle protecteur.

Un lien direct entre cellules NK et cellules infectées par *Mycobacterium tuberculosis hominis* (Mth) a ainsi été montré et dépend de l'interaction des récepteurs NKp46 et NKG2D présents sur les cellules NK avec les monocytes infectés (203). De plus, les cellules NK jouent un rôle fondamental dans le maintien des réponses CTL à l'infection par Mth chez les individus sains (204).

Les cellules NK complèteraient également la défense immunitaire contre le champignon opportuniste *Cryptococcus neoformans*, médiée par les CTL et leurs granzymes, par le biais d'un mécanisme dépendant de la perforine (205). Dans le cadre du paludisme, il a été démontré que les cellules NK interagissent directement avec les érythrocytes infectées par *Plasmodium falciparum* (iRBC), ce qui est nécessaire à la production d'IFN γ (206). Les cellules NK peuvent par ailleurs lyser les iRBC (207, 208). Il est donc possible qu'il existe des néoantigènes à la surface des iRBC qui interagissent avec des récepteurs des cellules NK et induisent un signal activateur. N.F. Delahaye et al. ont également mis en évidence une association entre un polymorphisme dans le promoteur du gène codant le récepteur NKp30 et la susceptibilité au paludisme (209).

G) 3. Cellules NK et greffes

Au-delà du rôle incontestable des cellules NK dans le succès du traitement des LAM après greffe de CSH, peu d'études fournissent de réelles preuves de l'implication directe des cellules NK dans la plupart des situations de rejet de greffes (210). Certaines équipes de recherche affirment cependant que les cellules NK ont un rôle dans le devenir des greffons, comme par exemple dans des modèles murins de rejet de greffe de moelle osseuse H2-incompatible (211), ou dans un modèle de transplantation cardiaque (212). Du fait de leur capacité à influencer la fonction de différentes cellules du système immunitaire, grâce à la production de diverses cytokines, il est malgré tout probable que ces cellules aient un rôle indirect dans la cascade de réactions menant au rejet de greffe (213).

G) 4. Particularité des cellules NK utérines (uNK) durant la placentation

L'évènement immunitaire essentiel est la tolérance par la mère du greffon allogénique que constitue le fœtus. Les mécanismes mis en œuvre sont encore largement incompris. Cette tolérance s'accompagne d'un remodelage tissulaire et vasculaire complexe. En effet, deux éléments sont indispensables à l'établissement d'une gestation normale dans l'espèce humaine :

- l'invasion du trophoblaste extra-villeux dans la membrane déciduale et dans le myomètre,

- et le remodelage des artères spiralées utérines.

A la fin des années 1990, A.A. Ashkar et al. ont démontré dans un modèle murin que les cellules NK de la déciduale (dNK) ont une fonction « constructrice » *in vivo* à l'interface foeto-maternelle et sont impliquées dans l'homéostasie placentaire (214). En effet, la déplétion des dNK de la déciduale induit l'implantation de l'embryon dans des sites anormaux et un remodelage inadéquat des artères spiralées déciduales. Ces dysfonctions seraient dues au manque d'IFN γ produit par les dNK. L'IFN γ joue ici un rôle de régulateur positif sur le diamètre des artères spiralées pendant la décidualisation (215). Il semble ainsi que les cellules dNK jouent un rôle crucial dans la vascularisation normale de la déciduale du fait de leur production de facteurs de croissance et de chimiokines. Ce processus de vascularisation est lui-même indispensable au développement normal de la gestation. L'activation des dNK permet en effet de réduire le risque de pré-éclampsie (216, 217). Les cellules NK représentent la majorité des leucocytes au niveau de l'utérus (50 à 70% des leucocytes et 30 à 40% des cellules du stroma décidual) en début de grossesse. Leur fonction exacte à ce niveau reste encore inconnue, mais différentes expériences montrent qu'elles jouent un rôle dans le processus complexe qu'est la placentation. Elles sont impliquées dans la coordination de l'accès des cellules du trophoblaste aux artères utérines. Ces cellules NK sont différentes des cellules NK circulantes du sang périphérique d'un point de vue à la fois phénotypique et fonctionnel (218, 219). Elles ont ainsi le phénotype CD56^{bright}CD16⁻, se rapprochant de leurs homologues sanguines, mais comportent aussi beaucoup de granules cytotoxiques (sans pour autant être aussi cytotoxiques que les NK CD56^{dim} du sang) et expriment les NCRs NKp30, NKp46 ainsi que NKp44 à leur état basal (220). La présence de NKp44 sur ces cellules dNK est probablement associée à un état d'activation différent, comme le suggère également l'expression du marqueur d'activation précoce CD69 à leur surface (221). D'après H. El Costa et al., NKp46 et NKp30 activent chacun une fonction NK : NKp46 (et NKG2C) active la fonction cytotoxique (contre-balancée par le récepteur inhibiteur NKG2A), NKp30 induit la production de molécules pro-inflammatoires telles que l'IFN γ , le TNF α , MIP-1 α & β et le GM-CSF (221).

Une meilleure compréhension de ces interactions ligands-récepteurs NKp30 et NKp46, durant une grossesse normale ou pathologique, représente donc un objectif important dans la compréhension des mécanismes de la reproduction chez l'Homme.

Le placenta représente également l'interface où a lieu la reconnaissance des cellules du trophoblaste, exprimant HLA-C, par les KIRs présents sur les cellules NK maternelles (222). Les gènes HLA-C et KIRs sont très polymorphes. Certaines combinaisons spécifiques de gènes codants pour le CMH chez le fœtus et pour les NKR chez la mère, comme le groupe HLA-C2/KIR2DS1, sont d'ailleurs corrélées avec le risque de développer une pré-éclampsie, une croissance restreinte du fœtus pouvant être mortelle ou encore une fausse couche (223-226). Ces observations suggèrent un rôle des cellules NK dans la tolérance foeto-maternelle.

Les recherches dans ce domaine en sont encore à leurs prémices et doivent être approfondies. L'accès à l'utérus à des étapes très précoces de la placentation humaine étant

très limité, les équipes de recherche tentent actuellement de développer des modèles murins au plus proche de l'Homme.

G) 5. Cellules NK et auto-immunité

Si les cellules NK sont surtout connues pour leur rôle dans la relation hôte-cancer ou hôte-virus, leur implication dans l'auto-immunité et les réactions inflammatoires suscitent un intérêt croissant (140, 227).

L'auto-immunité est classiquement comprise comme une activation inappropriée de cellules du système immunitaire adaptatif, LB et/ou LT, provoquant des dommages spécifiques d'un organe, d'un tissu ou parfois plus étendus (systémiques). On peut citer, parmi les maladies auto-immunes (MAI) les plus étudiées :

- la sclérose en plaques (SEP), maladie inflammatoire dans laquelle des LT auto-réactifs ciblent la myéline dans le système nerveux central (SNC),
- la polyarthrite rhumatoïde (PR), maladie systémique dans laquelle sont observées une inflammation des articulations et une destruction des cartilages,
- ou encore le diabète de type 1 (DT1), caractérisé par la destruction des cellules β productrices d'insuline au niveau du pancréas par des LT autoréactifs.

Comme discuté précédemment dans le chapitre I-F, au-delà de leur fonction cytotoxique classique, les cellules NK produisent des cytokines immunorégulatrices et influencent donc les réponses immunitaires innée et adaptative. Les cellules NK interagissent notamment avec les DC et les cellules T et peuvent donc également réguler leurs fonctions par ce moyen. Elles peuvent induire la maturation des DC, augmenter la fonction T CD4⁺ et promouvoir leur différenciation vers un profil « Th1 ». Elles peuvent aussi délivrer des signaux inhibiteurs afin d'assurer l'homéostasie immunitaire en tuant des macrophages trop activés, les iDC, des LT et LB activés ou encore en inhibant la réponse et la prolifération des LT autoréactifs (Fig.12).

L'initiation et le développement d'une MAI comportent plusieurs étapes :

- le relargage/l'exposition d'antigène(s) du soi issu(s) de l'organe cible,
- le « priming » dans les OLS,
- l'attraction/la migration des cellules immunitaires vers l'organe ou le tissu cible,
- la destruction de ces organes/tissus.

Les cellules NK peuvent intervenir à chacune de ces étapes, de façon tantôt protectrice, tantôt activatrice du processus auto-immun (Tableau 1) (227, 228). De plus, un phénomène pour le moins intéressant a été relevé par F.D. Shi et al. : les cellules NK sont présentes en grand nombre dans les organes qualifiés de « tolérants » comme le foie (où les cellules NK représentent 30 à 50% des lymphocytes), les poumons, l'utérus ou les intestins (229). Ceci suggère un rôle des cellules NK dans une forme de tolérance immunitaire et, dans le cadre d'une rupture de cette tolérance, dans l'auto-immunité qui en résulte.

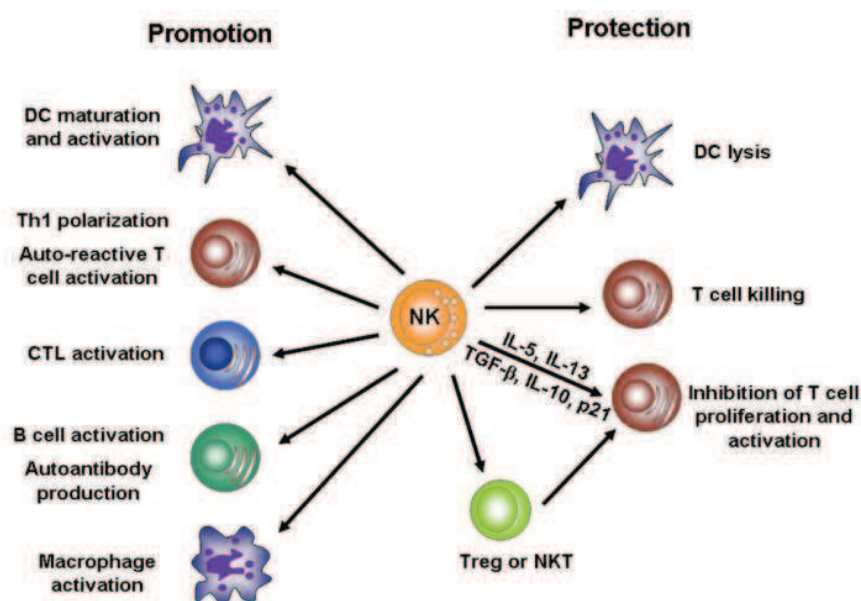


Figure 12 : Mécanismes putatifs par lesquels les cellules NK favoriseraient ou au contraire inhiberaient l'auto-réactivité (Schéma extrait de Z. Tian et al., *Journal of Autoimmunity*, 2012).

Tableau 1 : Implication des cellules NK dans les maladies auto-immunes, dans des modèles murins et dans l'espèce humaine (tableau extrait de P.Conigliaro et al., *Autoimmunity Rev.*, 2011).

Disease	Murine models (NK depletion)	Human diseases	
		Peripheral blood	Tissue site
Rheumatoid Arthritis	Protective/promoting	Reduced levels, impaired activity	Synovial membrane
Spondyloarthritis	Nd ^a	Impaired activity	Nd
Psoriasis	Nd	Reduced levels, impaired activity	Psoriatic skin lesion
Inflammatory bowel diseases	Protective	Normal levels, impaired activity	Colonic lamina propria
Diabetes	Protective	Reduced levels	Nd
Systemic lupus erythematosus	Protective	Reduced levels, impaired activity	Nd
Anti-phospholipid syndrome	Nd	Increased levels	Nd
Multiple sclerosis	Protective/promoting	Reduced levels, impaired activity	Nd
Myasthenia Gravis	Promoting	Reduced levels, impaired activity	Nd

^a Nd: not determined.

Diverses données sont en faveur d'une association entre le risque de développer une MAI et le polymorphisme des gènes HLA/KIRs. Ainsi, KIR3DS1 et KIR3DL1 sont associés, positivement pour le premier récepteur, négativement pour le second, à la spondylarthrite ankylosante (SpA). Les allèles KIR3DS1, KIR2DS1, KIR2DL5 et HLA-C ont été retrouvés plus fortement exprimés sur les lymphocytes de patients atteints de SpA et sont associés à une susceptibilité à la SpA en influençant l'activité NK (230, 231). Une fréquence accrue des gènes KIR2DL5 et KIR3DS1 a également été retrouvée chez des patients espagnols souffrant de SEP (232, 233). Des polymorphismes particuliers des gènes MICA et ULBP qui codent des ligands du récepteur NKG2D ont aussi été rapportés comme associés au psoriasis et au DT1 (234, 235).

D'un point de vue cellulaire, dans la SEP, les cellules NK CD56^{bright} exercent un effet régulateur de la pathologie en induisant une apoptose des LT activés, indépendante des caspases mais dépendante de granzymes K. Un traitement avec des anticorps monoclonaux anti-CD25 (daclizumab) augmente significativement cet effet en provoquant une expansion des CD56^{bright} (236). Ces résultats seraient donc en faveur d'un rôle protecteur des cellules NK dans la SEP. Cependant, les cellules NK ont également la capacité de promouvoir une réponse spécifique de l'auto-antigène en lysant directement les cellules et tissus du soi. Les cellules NK peuvent en effet exercer une activité cytotoxique envers les neurones, les oligodendrocytes, les astrocytes ou la microglie du SNC (233).

Une légère diminution de la fréquence des cellules NK a été observée dans le sang périphérique de patients diabétiques récemment diagnostiqués (DT1), diminution qui n'est plus détectable lorsque le diabète est établi. Chez les patients « à long terme », d'autres modifications ont cependant été observées, comme la diminution de la production d'IFN γ ou de l'expression de récepteurs activateurs NKp46, NKp30 et NKG2D (229, 233, 237, 238).

Dans différents modèles murins du DT1, les expériences réalisées indiquent un rôle promoteur des cellules NK dans la pathogénèse du DT1. Ainsi, dans un modèle de souris BDC2.5, la présence de cellules NK au niveau du pancréas permet de distinguer les formes délétères de l'inflammation des îlots de Langerhans (239). L'utilisation d'anticorps non déplétants dirigés contre NKG2D permet de prévenir le développement du diabète dans le modèle de la souris NOD (nonobese diabetic). Il ne faut cependant pas omettre que cet effet peut aussi être le résultat du blocage de ce récepteur exprimé sur d'autres cellules immunitaires que les cellules NK : les sous-populations de LT CD4⁺ et CD8⁺ (240). Dans un modèle de souris transgénique (NOD/BCD2.5), il a été montré que les LTreg régulent l'AI pancréatique en inhibant les cellules NK, et plus particulièrement leur production d'IFN γ (241). Enfin, le récepteur activateur NKp46 a été indiqué comme un facteur essentiel au développement du DT1 chez la souris NOD par C.A. Gur et al. (242).

De façon surprenante, cependant, la souris NOD présente un déficit important de l'activité NK, ce qui en fait un outil privilégié pour les greffes de tissus humains. Ce déficit, qui est de nature polygénique (243), est difficile à concilier avec les observations expérimentales mentionnées ci-dessus. Il est en revanche cohérent avec la diminution des cellules NK chez les patients dont le diabète est récent.

Chez des patients avec une arthrite juvénile, on retrouve aussi une fréquence diminuée des cellules NK ainsi qu'une fonction NK altérée et une activation excessive du système immunitaire, en particulier des macrophages (228, 233). Des déficits quantitatifs et qualitatifs (maturation et/ou activation/fonction) des cellules NK ont par ailleurs aussi été observés dans d'autres MAI comme le psoriasis et le lupus systémique érythémateux (SLE).

Les cellules NK isolées à partir des articulations de patients atteints de PR expriment de plus forts niveaux de marqueurs d'activation et produisent plus d'IFN γ après stimulation avec des cytokines que les cellules NK du sang périphérique du même patient. Ces cellules NK sont essentiellement de phénotype CD56^{bright} et induisent la différenciation des

monocytes en DC. Les cellules NK s'accumuleraient dans les sites inflammatoires et interagiraient avec les monocytes dans un système d'activation réciproque amplifiant ainsi l'inflammation, et facilitant son passage à la chronicité. Une étude récente, réalisée *in vitro*, suggère par ailleurs un rôle des cellules NK dans l'induction de la différenciation de monocytes CD14⁺ en ostéoclastes (244), favorisant ainsi la destruction de l'os péri-articulaire caractéristique de la pathologie.

La myasthénie auto-immune acquise généralisée (MG, pour « myasthenia gravis ») est une MAI de la jonction neuromusculaire dans laquelle les LB produisent des auto-anticorps dirigés contre le récepteur à l'acétylcholine (RACH, présents chez 85% des patients). Dans le modèle murin de la MG, la myasthénie auto-immune expérimentale (EAMG), les cellules NK ont été impliquées dans l'initiation de la maladie à travers la promotion d'une réponse Th1 et l'augmentation de la production d'auto-anticorps par les LB (245). La suppression des cellules NK, par déplétion avec un anticorps anti-NK1.1 ou par inactivation chez des souris IL-18^{-/-}, durant la phase d'initiation de l'EAMG entraîne une diminution de la production d'anticorps anti-RACH et améliore la pathologie. L. Casciola-Rosen et al. ont plus tard mis en évidence l'implication du granzyme B dans l'étiologie de la MG en montrant, d'une part que cette enzyme était capable de cliver les sous-unités du RACH, ce qui pourraient générer de nouveaux fragments antigéniques pouvant mener à une réponse auto-réactive, et, d'autre part, que cette enzyme était présente dans le thymus des patients myasthéniques et absente du thymus de sujets sains. Cette implication du granzyme B, supposant un rôle direct des cellules NK au site d'initiation de la MG, est à analyser de façon plus précise afin de savoir si l'effet ne provient pas de l'autre population lymphocytaire capable de produire cette enzyme: les CTL (246). Chez l'Homme, FD. Shi et Q. Zhou ont observé une diminution du nombre de cellules NK CD57⁺ chez les patients myasthéniques (247).

De façon générale, les différentes données suggèrent un rôle des cellules NK dans la pathogénèse des MAI, qu'il soit bénéfique ou délétère. Cependant, ces données sont sujettes à controverses et méritent d'être approfondies. Elles sont, en effet, dépendantes du modèle expérimental utilisé, de la méthode de manipulation des cellules NK ou de la spécificité des anticorps par exemple. Les cellules NK doivent probablement avoir des rôles variables selon les organes/tissus où elles se trouvent et selon les différents stades d'évolution de la pathologie. Les effets des cellules NK peuvent aussi être divergents selon le sous-type de cellules NK auquel on s'intéresse. Le rôle précis et les mécanismes de régulation des cellules NK dans l'auto-immunité restent donc encore mal compris et de plus amples investigations doivent être menées pour déterminer le rôle des différents sous-types de cellules NK dans les MAI (influence du microenvironnement local) et à différents stades.

H) Les récepteurs des cellules NK (NKR)

Les cellules NK sont capables de reconnaître une grande diversité de molécules à la surface de leurs cibles du fait de leur grand nombre de récepteurs membranaires et du polymorphisme souvent important de ces derniers. La cellule NK reçoit de ses récepteurs des signaux tantôt activateurs, tantôt inhibiteurs qu'elle doit intégrer pour répondre au mieux aux stimuli qu'elle perçoit dans son proche environnement (Fig.13).

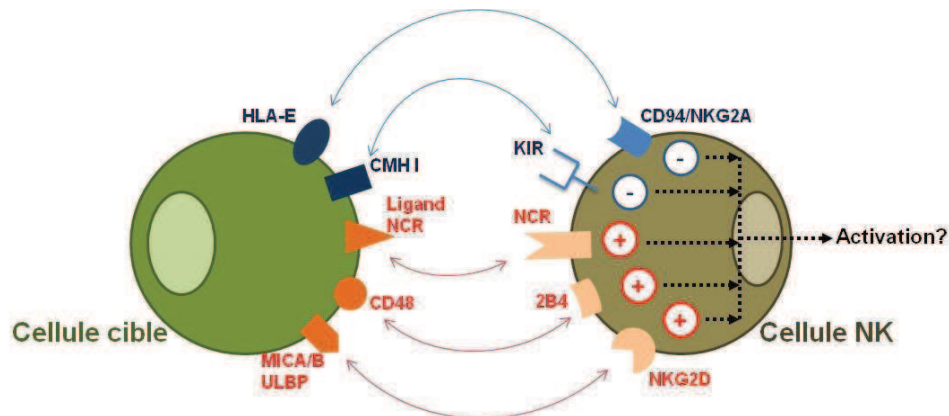


Figure 13 : Intégration des différents signaux perçus par la cellule NK face à sa cellule cible nécessaire à la détermination de l'activation ou non de la fonction NK (cytotoxique et/ou de production de cytokines).

Les récepteurs activateurs (CD16, NKG2D, NCRs) détectent les changements d'expression de leurs ligands induits par le stress ou la modification cellulaire. Ces ligands sont généralement des protéines du soi qui la plupart du temps sont rares à la surface des cellules normales mais dont l'expression augmente sur les cellules transformées (infectées ou tumorales). Les récepteurs inhibiteurs (KIRs, CD94/NKG2A) perçoivent les modulations de présentations de molécules de CMH de classe I à la surface cellulaire (248).

H) 1. Le récepteur CD16 ou FcγRIIIa

Le CD16 est un récepteur transmembranaire de type I contenant deux domaines extracellulaires de type immunoglobuline (Ig). Il reconnaît avec une faible affinité le fragment Fc des IgG liées à un antigène, en solution ou à la surface d'une cellule cible modifiée et induit une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la lyse de la cible (par ADCC – voir chapitre précédent). Après cross-linking de CD16, le signal est transduit par le récepteur FcεRI et la chaîne ζ du TCR (CD3ζ), provoquant une augmentation du calcium intracellulaire qui mène à la dégranulation des cellules NK (249).

Au-delà de son rôle dans l'ADCC, CD16 peut exercer une fonction cytotoxique après fixation des ligands appropriés directement sur les cellules-cibles (250). Bryceson et al. ont par la suite montré que l'engagement du CD16 en lui-même est suffisant pour activer la lyse

de cellules-cibles de façon dépendante des anticorps dans les cellules NK quiescentes, alors que les autres récepteurs activateurs testés, comme NKp46 ou NKG2D, requièrent l'engagement d'un autre récepteur (251).

CD16 est intensément exprimé à la surface des cellules NK circulantes, essentiellement CD56^{dim}. Une expression beaucoup plus faible de CD16 est retrouvée à la surface des cellules NK tissulaires dont le phénotype prédominant est CD56^{bright}.

L'engagement direct du récepteur CD16 ou la stimulation *in vitro* de cellules NK avec de la PMA (activateur de la PKC) induit une diminution rapide de l'expression du CD16 à la membrane des cellules NK par « shedding » ou par internalisation (252). Cette diminution est régulée par la phospholipase C spécifique de la phosphatidylcholine située au niveau des radeaux lipidiques.

H) 2. Les Récepteurs de la famille « Killer Immunoglobulin-like » (KIRs)

La diversité du répertoire de reconnaissance des cellules NK est considérable et est en grande partie déterminée par le système récepteur/ligand extrêmement polymorphe des KIRs et des allotypes HLA de classe I.

Les 14 gènes codant les récepteurs KIRs sont regroupés sur le chromosome 19 (locus 19q13.4) en un complexe des récepteurs leucocytaires (LRC). Les séquences des KIRs humains, au niveau de leurs domaines extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire sont remarquablement bien conservées ; cependant, les gènes KIRs ont évolué pour former une famille de récepteurs hautement polymorphes et se sont probablement multipliés par des mécanismes de duplications et recombinaisons (253).

Les KIRs inhibiteurs reconnaissent principalement des molécules HLA de classe I du soi (allèles particuliers de HLA-A, -B ou -C), dont le défaut d'expression par une cellule infectée ou tumorale est un des grands mécanismes de levée de l'inhibition de la cytotoxicité NK (comme cela a été présenté précédemment). Ces KIRs inhibiteurs présentent une longue queue intra-cytoplasmique (KIR-L ; -L pour « long ») portant deux ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif). Chaque KIR possède 2 ou 3 domaines extracellulaires de type Ig et sont, en conséquent, dénommés KIR2DL ou KIR3DL. Ces domaines leur confèrent une spécificité pour leurs ligands HLA de classe I: HLA-C ou HLA-B et certains HLA-A respectivement.

Les récepteurs KIR2DL1 et KIR2DL2/3 reconnaissent les allèles HLA-C principalement en fonction du polymorphisme de l'acide aminé situé en position 80 dans le domaine $\alpha 1$ de leurs chaînes lourdes. KIR2DL1 reconnaît les allotypes dits « HLA-C2 » possédant une lysine à cette position et correspondant à HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5 et -Cw6. KIR2DL2/3 reconnaissent quant à eux les allèles HLA-C1 ayant une asparagine en position 80. Collectivement, KIR2DL1 et KIR2DL2/3 peuvent ainsi détecter tous les allotypes HLA-C (254).

Homologues aux KIR-L, les KIR-S ont une courte queue intra-cytoplasmique (-S pour « short ») et sont donc associés à un adaptateur moléculaire porteur d'ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif), DAP12, grâce à un acide aminé chargé positivement au niveau de leur partie transmembranaire (255). On retrouve, à priori, un équivalent KIR-S à tous les KIR-L. Du fait du partage de domaines extracellulaires identiques, les KIR2DS reconnaissent les mêmes ligands que KIR2DL (Fig. 14). De façon générale, cependant, les KIRs inhibiteurs montrent une plus grande affinité pour les molécules HLA-C que les KIRs activateurs et dans le cas d'une co-expression, le signal inhibiteur semble être dominant (256).

Il existe une exception à cette dichotomie de la classification des KIRs établie selon la longueur de la queue intra-cytoplasmique : le membre KIR2DL4 dont l'interaction avec son ligand peut engendrer une signalisation intracellulaire activatrice (en interagissant avec l'adaptateur FcεRIγ) ou inhibitrice (ITIM). La composante activatrice semble cependant être plus importante (257, 258) (Fig. 14).

Au contraire des autres KIRs, KIR2DL4 est exprimé par toutes les cellules NK et est spécifique d'une molécule de CMH I non classique : HLA-G (259). Initialement décrite comme exprimée de façon sélective à l'interface mère/fœtus au niveau des cellules du cytotrophoblaste afin de contribuer à la tolérance foeto-maternelle, HLA-G est aussi retrouvée augmentée après une greffe d'organe, une infection virale ou encore dans certaines MAI (260). De forts taux de HLA-G ont d'ailleurs été retrouvés sur les cellules tumorales de patients souffrant d'un carcinome rénal (261) (262). De plus, tout comme HLA-E, une augmentation de la forme soluble de HLA-G a été retrouvée dans le sérum de patients porteurs de tumeurs solides et a été associée au mécanisme d'échappement tumoral (263).

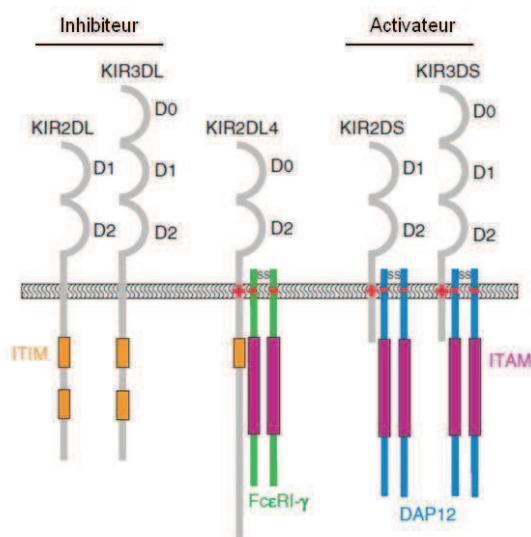


Figure 14 : Différences de structures majeures entre les membres de la famille des récepteurs KIRs (schéma extrait de Campbell KS. & Purdy AK., *Immunology*, 2011)

Il existe une autre nomenclature des KIRs sous la forme Cluster de Différenciation 158 avec l'ajout d'une lettre qui correspond au locus du gène dans le LRC. CD158a, par exemple, correspond au récepteur KIR2DL1 (Tableau 2).

Un système équivalent de reconnaissance du CMH de classe I est retrouvé chez les rongeurs : la famille des récepteurs Ly49. Ces derniers ont cependant une structure très différente des KIRs humains : ce sont des dimères de molécules de type lectine C (264).

Gene name ¹	CD designation	Number of Alleles ²	Recognition motif on HLA ligands
<i>KIR2DL1</i>	CD158a	26	HLA-C Group 2
<i>KIR2DL2</i>	CD158b1	15	HLA-C Group 1, and some HLA-C Group 2 and HLA-B
<i>KIR2DL3</i>	CD158b2	11	HLA-C Group 1, and some HLA-C Group 2 and HLA-B (weaker affinity than 2DL2)
<i>KIR3DL1</i>	CD158e1	59	Bw4 epitopes among HLA-B allotypes and some HLA-A
<i>KIR3DL2</i>	CD158k	25	Certain HLA-A allotypes
<i>KIR3DL3</i>	CD158z	56	Unknown
<i>KIR2DL5A</i> ⁴	CD158f	10	Unknown
<i>KIR2DL5B</i> ⁴	CD158f	21	Unknown
<i>KIR2DL4</i>	CD158d	27	HLA-G
<i>KIR2DS1</i>	CD158h	15	HLA-C Group 2 ⁵
<i>KIR2DS2</i>	CD158j	20	HLA-C Group 1 ⁵
<i>KIR2DS3</i>	No CD assigned	12	HLA-C Group 1 ⁵
<i>KIR2DS4</i>	CD158i	30	HLA-C (some of both Group 1 and 2), A*11 ⁵
<i>KIR2DS5</i>	CD158g	14	Unknown
<i>KIR3DS1</i>	CD158e2	16	HLA-Bw4? ⁷

Tableau 2 : Produits d'expression des gènes KIRs et leurs ligands HLA de classe I (Extrait de Campbell KS. & Purdy AK., *Immunology*, 2011).

Les ligands des récepteurs KIR2DL5, KIR3DL3 et KIR2DS5 restent encore inconnus à ce jour (265).

Il est à noter que l'expression des récepteurs KIRs n'est pas restreinte aux cellules NK et peut être retrouvée à la surface d'une sous-population de LT CD8⁺. Les KIR-L sont d'ailleurs impliqués dans l'inhibition du signal TCR dans certains cas de lymphocytes infiltrants les tumeurs. Une expression de novo de KIRs sur les LT a par ailleurs été associée à une stimulation chronique de ces cellules en réponse à des infections virales récurrentes (254).

La répartition des gènes codant pour les récepteurs KIRs est différente d'un individu à l'autre. De plus, les gènes KIR présentent un important polymorphisme allélique (Tableau 2). Les mécanismes qui sous-tendent l'acquisition des KIRs par les cellules NK au cours de leur développement restent encore mal compris. En effet, tous les KIRs ne sont pas présents en même temps sur les cellules NK chez un individu donné. Toutefois, quatre KIRs inhibiteurs dominant dans la population humaine : KIR2DL2/3, KIR2DL1, KIR3DL1 et KIR3DL2 (266). La plupart des cellules NK chez un même individu expriment ainsi un ou deux KIRs avec au moins un récepteur inhibiteur spécifique du CMH de classe I.

On distingue différents sous-types de cellules NK selon le niveau d'expression des KIRs. En effet, chez un même individu, on peut retrouver des cellules NK dépourvues de KIRs, d'autres n'en exprimant qu'un ou encore certaines en exprimant plusieurs. Le répertoire des

ligands HLA d'un individu doit néanmoins influencer, à un certain niveau, la proportion relative de ces différents sous-types. Une expression aussi aléatoire doit d'ailleurs probablement engendrer des cellules auto-réactives. Une cellule NK qui exprime plusieurs KIRs a un plus fort potentiel cytotoxique sur sa cellule-cible qu'une cellule NK n'en n'exprimant qu'un ou pas du tout (décrit dans la partie précédente I-E). Il est à garder en mémoire que le résultat final d'une réponse NK dépend aussi de la densité en ligands activateurs et du milieu cytokinique. Comme présenté précédemment, les cellules NK n'ayant pas de KIR inhibiteur, bien que classiquement qualifiées de « sous-répondeuses », exercent une activité anti-virale puissante, probablement du fait d'une forte production de cytokines et d'une grande densité de ligands activateurs sur la cellule-cible infectée (77).

De façon intéressante, différentes études ont rapporté des associations génétiques entre des combinaisons KIR/HLA particulières et la susceptibilité ou la résistance à des infections virales, des cancers, des MAI ou des pathologies de la reproduction (267, 268). Ainsi, les individus porteurs du récepteur KIR2DL3 et homozygote pour HLA-C1 éliminent plus efficacement le VHC et contrôlent l'infection mieux que les autres (269). Inversement, la présence du récepteur KIR3DS1 prédispose au cancer du col de l'utérus. Le risque de développer ce cancer est encore plus important dans le cas où la combinaison inhibitrice KIR/HLA protectrice fait simultanément défaut (270).

Logiquement, tant dans les pathologies infectieuses que tumorales, les combinaisons KIR/HLA contribuant à la stimulation NK sont bénéfiques alors que la progression de la maladie est facilitée lorsque l'inhibition NK surpasse l'activation. A l'opposé, les MAI sont favorisées par une combinaison KIR/HLA faiblement inhibitrice. Ainsi, la combinaison KIR2DS1 ou KIR2DS2 avec l'allèle homozygote de HLA-Cw est associée à une plus grande susceptibilité aux arthropathies psoriatiques (271). Dans le DT1, la combinaison KIR2DS2/HLA-C1 associée à un défaut de paires KIR/HLA inhibitrices est plus fréquente chez les patients diabétiques que chez les individus sains (272).

Certaines stratégies actuellement développées en thérapeutique anti-cancéreuse reposent sur la modulation de l'activité NK par la manipulation de KIRs. Diverses études cliniques et pré-cliniques ont démontré que la réactivité des cellules NK peut être essentielle dans l'immunosurveillance des tumeurs. L'exemple le plus connu consiste en la transplantation de CSH pour traiter la LAM avec un rôle important de l'incompatibilité KIR/HLA de classe I et des NK allo-réactives (du donneur). Néanmoins, le plus souvent les allo-transplantations réalisées sont basées sur une compatibilité totale entre les systèmes HLA du donneur et du receveur: l'incompatibilité KIR ne peut donc être obtenue (248).

Le blocage des KIRs des cellules NK est également à l'étude avec par exemple l'anticorps monoclonal 1-7F9 qui bloque les KIRs KIR2DL1/2/3 présents sur la moitié des cellules NK et, par conséquent, l'inhibition imposée par tous les allèles HLA-C, permettant ainsi de récupérer une activité anti-tumorale efficace (179).

L'ontogénie, la maturation, les propriétés migratoires et la demi-vie des cellules NK sont autant de voies à approfondir dans le but de valoriser au mieux ces nouvelles approches thérapeutiques.

H) 3. La famille des récepteurs « Immunoglobulin-like transcripts » (ILTs)

Les ILT constituent une autre famille de récepteurs inhibiteurs de type Ig. Ils sont exprimés à la surface des LB, LT, cellules myéloïdes et un sous-groupe de ces récepteurs est aussi exposé à la membrane des cellules NK. Ils peuvent être retrouvés sous le nom de LI(L)Rs pour « Leukocytes Ig-like Receptors » ou MIRs pour « macrophage Ig-like receptors ». Les gènes codant pour ces ILTs, comme les gènes KIRs, sont localisés sur le chromosome 19. Parmi les 13 gènes identifiés, seuls deux d'entre eux (ILT2 et ILT4) codent des récepteurs inhibiteurs reconnaissant des molécules du CMH de classe I (273).

ILT2 (ou LILRB1 ou LIR-1 ou MIR7 ou CD85j) est le seul membre de sa famille à être exprimé sur des cellules NK. Sa portion extracellulaire est composée de 4 domaines Ig-like et sa queue cytoplasmique contient 4 ITIMs. ILT2 reconnaît un large panel de molécules HLA classiques et a une forte affinité pour la molécule HLA-G (274). De plus, ILT2 peut fixer l'homologue du CMH de classe I du CMV, UL18, avec une meilleure affinité que le CMH de classe I lui-même (275). Comme pour les KIRs, l'interaction entre ILT2 et son ligand mène à l'inhibition de la fonction NK : le CMV empêche ainsi la lyse de sa cellule-hôte.

H) 4. Les récepteurs Natural-Killer Group 2 (NKG2)

Les récepteurs NKG2 appartiennent à la superfamille des récepteurs de type lectine C. Ces récepteurs comportent un domaine protéique fixant les carbohydrates semblable aux lectines et nécessitant du calcium pour cette fixation (« type C »). Les gènes codant pour ces récepteurs sont regroupés dans la région du complexe de gènes NK (NKC) sur le chromosome 12 (locus 12p13.2). Un équivalent de cette famille de récepteurs est retrouvé chez les rongeurs (chez la souris, ces gènes sont portés par le chromosome 6). Cette famille regroupe des récepteurs activateurs et inhibiteurs qui peuvent être retrouvés à la surface de LT.

Les hétérodimères CD94 (ou KLRD1) / NKG2.

NKG2A et ses 4 variants moléculaires NKG2B, C, E et F s'associent à la glycoprotéine transmembranaire CD94 pour former des hétérodimères covalents grâce à un pont disulfure. Cette association est nécessaire à la translocation des récepteurs NKG2 à la surface de la cellule et à la reconnaissance de leurs ligands, les molécules de CMH de classe I non conventionnelles telles que HLA-E, ou Qa-1 chez la souris (276). Au contraire des gènes KIRs, les gènes codant pour CD94 et NKG2 ont un polymorphisme limité. Ces récepteurs NKG2 partagent une structure commune constituée en plus d'un domaine extracellulaire lectin-like de type C, d'une zone transmembranaire permettant d'interagir avec CD94 et d'un segment

cytoplasmique. Ces récepteurs sont exprimés à la surface de la plupart des cellules NK, des $LT\gamma\delta^+$ et sur un sous-type de $LT\alpha\beta^+$ effecteurs/mémoires $CD8^+$.

NKG2A (ou KLRC1) comporte deux domaines ITIM dans sa portion intracytoplasmique et induit donc un signal inhibiteur (tout comme son variant d'épissage alternatif NKG2B) (277).

Au contraire, NKG2C (ou KLRC2) induit un signal activateur (de même que NKG2E) et requiert la protéine adaptatrice DAP12 (porteuse d'ITAM) pour être exprimé de façon stable à la membrane et provoquer la cascade de signalisation intracellulaire (278).

NKG2F possède un domaine cytoplasmique et un segment transmembranaire contenant un résidu chargé mais ne présente pas de région extracellulaire du fait d'un codon stop rompant prématurément le domaine « lectin-like » (279).

L'affinité des récepteurs NKG2 pour leurs ligands semble être différente pour chaque récepteur. Tout comme dans le cas des KIRs, le dimère inhibiteur CD94/NKG2A aurait une plus forte affinité pour les molécules HLA-E, et donc un effet dominant par rapport au couple activateur CD94/NKG2C (280). De façon intéressante, l'affinité du récepteur pour son ligand dépend ici de la séquence du peptide HLA-E et non de différences alléliques (281).

NKG2D (ou CD314 ou KLRK1 pour "Killer cell lectin-like receptor subfamily K 1")

NKG2D est un récepteur co-stimulateur et activateur exprimé sous la forme d'homodimères à la surface des cellules NK, des $LT\alpha\beta^+$ $CD8^+$, des $LT\gamma\delta^+$ et des macrophages activés. NKG2D s'assemble avec 4 molécules de DAP10 pour former un complexe hexamérique et induire un signal activateur (76, 282) (Fig. 15). Le gène codant NKG2D est très conservé au cours de l'évolution (283, 284).

NKG2D est un des récepteurs activateurs des cellules NK les mieux caractérisés. Son expression peut être positivement ou négativement régulée par diverses cytokines. L'IL-2, l'IL-12, l'IL-15, l'IL-18, le $TNF\alpha$ et l' $IFN\alpha$ induisent son expression alors que le $TGF\beta$ l'inhibe. Il complète l'action des NCRs dans la lyse des cellules tumorales et peut avoir un rôle dans l'induction de la production de cytokines et chimiokines dans certains cas. Si l'on masque l'effet des NCRs et de NKG2D, on observe une inhibition complète de la lyse médiée par les cellules NK des cellules cibles.

NKG2D se fixe à deux grandes catégories de ligands : MHC-class I-related Chain A et B (MICA et MICB) et les cytomegalovirus UL16-binding proteins 1 à 6 (ULBP1-6). Ce sont des homologues des molécules du CMH de classe I.

MICA et MICB sont hautement polymorphes : 70 allèles MICA et 31 allèles MICB ont été décrits. Leurs gènes se trouvent sur le chromosome 6 dans la région du CMH. Comme les molécules HLA de classe I, avec lesquelles elles partagent 28 à 35% d'homologie de séquence, MICA et MICB sont composées de 3 domaines extracellulaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$) mais ne s'associent ni à la $\beta 2$ -microglobuline pour être exposées à la membrane cellulaire ni à aucun autre peptide.

ULBP1 et ULBP2 ont été les premiers ligands identifiés et sont les deux seuls membres de la famille à effectivement se lier à l'UL16 du CMV.

Les ligands de NKG2D sont rarement détectés à la surface des cellules normales, à l'exception de MICA qui est exprimé de façon constitutive au niveau des cellules épithéliales intestinales (285). Ces ligands sont surexprimés en situation de stress cellulaire, lors d'une transformation maligne ou d'une infection virale, mais les mécanismes de leur induction restent mal connus. Par ailleurs, les macrophages trop stimulés expriment les ligands de NKG2D et sont alors éliminés par les cellules NK (135).

Plusieurs études ont montré que l'expression de ligands de NKG2D à la surface de tumeurs les rend sensibles à la lyse NK *in vitro* et mène au rejet des tumeurs transplantées *in vivo* (286). En plus des ligands de NKG2D fixés à la membrane des cellules cibles, il existe des formes sécrétées de ces molécules. Il a par exemple été rapporté une sécrétion de MICA par des cellules tumorales et la présence de taux élevés de MICA soluble sérique (sMICA) dans toute une variété de cancers : cancer colorectal, cancer du foie, cancer de la prostate ou encore mélanome (76). Une sécrétion de MICB a aussi été détectée dans diverses tumeurs (287). Le sMICA est d'ailleurs utilisé comme marqueur de cancer à des stades précoces, tandis que la détection de MICB dans le sérum de patients serait associée à un stade plus avancé de la maladie, voire à des métastases (288). Des protéines de la famille ULBP peuvent aussi être sécrétées par les cellules tumorales. Récemment, la présence d'ULBP2 soluble dans le sérum de patients atteints de mélanome a été démontrée comme étant un indicateur de mauvais pronostic (289).

Au-delà de son rôle dans l'immunité anti-tumorale, NKG2D serait aussi impliqué dans d'autres pathologies comme les MAI telles que la PR ou le DT1 (290, 291). Il a également été démontré que les virus ont développé différents mécanismes d'échappement à la reconnaissance et l'élimination médiées par NKG2D soulignant ainsi un rôle important de ce récepteur dans le contrôle des infections virales (292, 293). Certaines études suggèrent enfin un rôle de NKG2D dans le devenir des greffes d'organes (294).

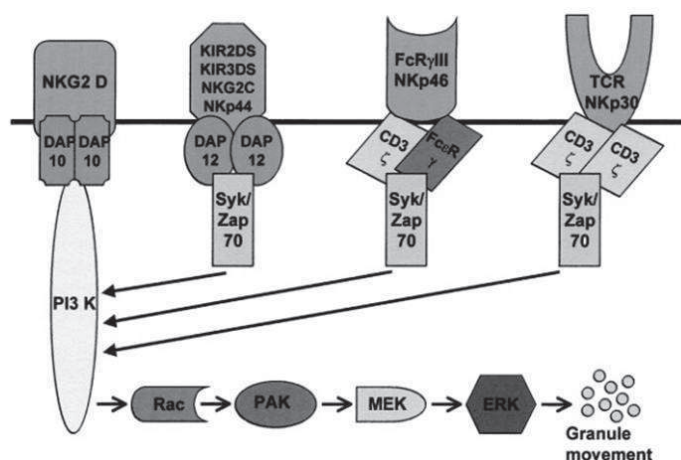


Figure 15 : Réseau des récepteurs activateurs contrôlant la cytotoxicité NK (JY. Djeu et al., *Clinical Cancer Research*, 2002).

H) 5. La famille des Récepteurs à Cytotoxicité Naturelle (NCRs)

La famille NCR comporte 3 récepteurs activateurs des cellules NK jouant un rôle critique dans la cytotoxicité NK dirigée contre les tumeurs dans un contexte indépendant du CMH de classe I (295). Ces 3 NCRs, NKp46 puis NKp44 et enfin NKp30, ont été identifiés à la fin des années 1990 par l'équipe d'A. Moretta (296-298). Ils appartiennent à la superfamille des Ig. Leur structure tridimensionnelle a été déterminée à partir de 2003 (NKp46) par cristallographie. Cependant, à la différence de NKG2D, la caractérisation des molécules-ligands interagissant avec les NCRs reste incomplète (299).

NKp46 (ou NCR1 ou CD335) est une glycoprotéine de 46 kDa caractérisée par une portion extracellulaire constituée de deux domaines immunoglobuliniques de type C2 et d'une région de liaison de 40 acides aminés (a.a.), comportant 3 sites de glycosylation dont un dans le domaine Ig D2, par une région transmembranaire contenant l'acide aminé chargé (arginine) impliqué dans la stabilisation des interactions avec les molécules associées, et par une courte partie intra-cytoplasmique hautement chargée, constituée de 25 a.a. et dépourvue de motifs typiques de l'induction d'une cascade de signalisation intracellulaire activatrice (299). NKp46 est donc couplée à des polypeptides porteurs d'ITAM : CD3 ζ et Fc ϵ R1 γ (296) (Fig. 16) qui mènent à la phosphorylation de Lck et ZAP70 (Fig. 15). Bien qu'associée aux récepteurs NKp30 et NKp44 du fait de leur fonction, NKp46 montre peu de similitude de structure avec les autres NCRs (Fig. 16). Les molécules dont la structure serait plus proche correspondraient plutôt aux KIRs ou à ILT2. NKp46 doit utiliser une région similaire de fixation du ligand (299). Le gène NCR1 est d'ailleurs situé sur le chromosome 19 comme les gènes codants pour les KIRs ou les ILTs (au locus 19q13.42). Cinq variants d'épissage alternatif de NCR1 ont été identifiés à ce jour (<http://www.ensembl.org/>).

NKp46 est exprimé à la surface de toutes les cellules NK qu'elles soient quiescentes ou activées. Ce récepteur est régulièrement utilisé comme marqueur spécifique des cellules NK. Longtemps décrite comme restreinte aux cellules NK, son expression a, par la suite, été détectée dans les LT intra-épithéliaux intestinaux de patients souffrant de la maladie cœliaque, dans des LT CD8⁺ en culture et issus de sang de cordon ombilical et, plus récemment, dans une très petite fraction de cellules CD3⁺CD56⁺ dans le sang d'individus sains. Cette fraction est retrouvée augmentée chez des patients leucémiques (13, 300, 301). Il existe un homologue de ce NCR chez la souris (avec environ 58% d'identité).

A l'exception de l'hémagglutinine (HA) virale, exprimée sur les cellules infectées par le virus de la grippe (200), ou encore de la vimentine des mycobactéries (299), les ligands potentiels de ce récepteur sur les tumeurs restent inconnus malgré le fait que celui-ci ait été impliqué dans la reconnaissance et la lyse de diverses cellules cancéreuses. En plus de son rôle dans l'éradication des tumeurs et dans l'induction de la production de cytokines par les cellules NK, NKp46 a aussi été invoqué dans le processus d'immuno-édition des tumeurs (302).

C. Gur et al. ont montré en 2010 son implication dans le modèle de la souris NOD, à la phase précoce de la pathogénèse (242, 303). Ce travail est cependant controversé puisque 2 ans plus tard, l'équipe de LL. Lanier réfute l'idée d'une intervention des cellules NK dans le diabète de ce même modèle (304).

Très récemment, il a, par ailleurs, été démontré que les cellules NK peuvent lyser les neutrophiles par un mécanisme passant par le récepteur NKp46 (105).

Enfin, les travaux remarquables de l'équipe d'E. Vivier ont permis de révéler le rôle clé de NKp46 dans l'ontogénie des cellules NK murines (305) (voir Section I-D).

NKp44 (ou NCR2 ou CD336) est une glycoprotéine de 44 kDa constituée d'un seul domaine extracellulaire immunoglobulinique de type V et d'une tige de 64 a.a. contenant de nombreux sites de glycosylation (299). Ce domaine comporte une paire de cystéines additionnelles probablement impliquées dans la formation d'un pont disulfure intra-domaine. Sa région transmembranaire contient un acide aminé chargé : la lysine. A la différence des autres NCRs, NKp44 s'associe aux molécules adaptatrices KARAP/DAP12, porteuses d'ITAM, pour induire un signal activateur dans la cellule NK après liaison avec son ligand (Fig. 15 et 16) (297). Le gène NCR2 est situé sur le chromosome 6 dans la région du CMH étendu (locus 6p21.1) et seulement 3 variants d'épissage de ce gène ont été décrits jusqu'à présent (<http://www.ensembl.org/>).

NKp44 est exprimé de façon sélective à la surface des cellules NK activées et doit coopérer avec NKp46 dans le processus de lyse non restreinte par le CMH. L'expression de NKp44 peut aussi être induite dans les LT CD4⁺ de patients VIH⁺ par le peptide gp41 et est corrélée à la réduction progressive du nombre de LT CD4⁺ durant l'infection par le VIH (306). Récemment, il a été démontré que NKp44 est exprimée de façon constitutive dans une sous-population de cellules NK nommée NK-22 et située dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (115).

Comme NKp46, NKp44 fixe l'HA virale, reconnaît ainsi les cellules infectées et peut en induire la lyse (307). NKp44 a également été décrit comme impliqué directement dans la reconnaissance et la fixation de bactéries pathogènes (comme *Mycobacterium* ou *Pseudomonas aeruginosa*) par les cellules NK (308). L'expression des ligands de NKp44 est variable à la surface des cellules tumorales et semble être liée à celle des ligands de NKp30 (309).

NKp30 (ou NCR3 ou CD337) est une glycoprotéine de 30 kDa constituée d'une partie extracellulaire avec un domaine immunoglobulinique de type C, avec une courte tige de 5 a.a., d'un segment transmembranaire (contenant un acide aminé chargé nécessaire aux interactions avec d'autres molécules) ainsi que d'une queue intra-cytoplasmique dépourvue de motif de signalisation. NKp30 s'associe donc à des molécules adaptatrices porteuses d'ITAM, telles que le dimère de CD3ζ ou le FcRγ (Fig. 16) (298). La liaison de NKp30 à son

ligand induit rapidement l'activation de la voie canonique de NF κ B dans les cellules NK (Fig. 15) (310).

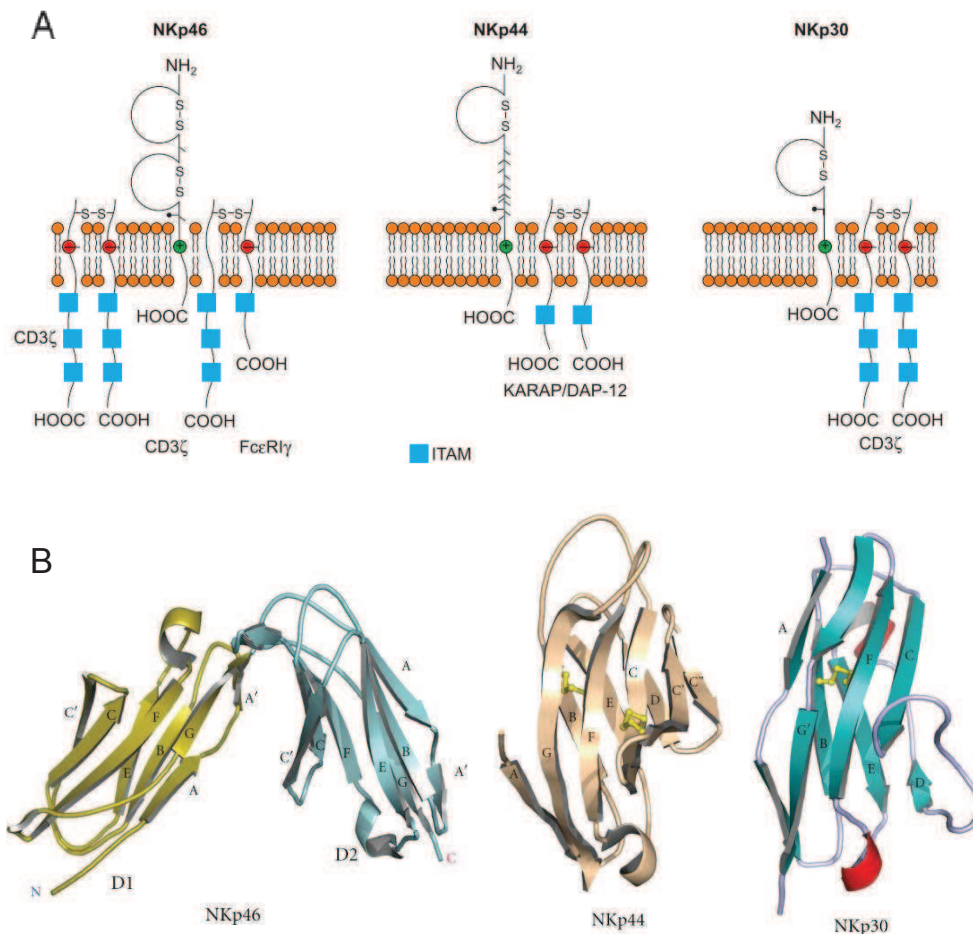


Figure 16 : Structure des NCRs. (A). Représentation schématisique des NCRs (Moretta, *Immunology today*, 2000). (B). Représentation tridimensionnelle (Joyce and Sun, *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011). Sur NKp44 et NKp30, sont schématisés en jaunes les ponts disulfures nés de l'interaction de deux cystéines entre deux feuillets β de la structure.

NKp30 est un récepteur activateur important des cellules NK qui coopère avec les deux autres NCRs pour induire la lyse de toute une variété de cellules tumorales.

Au-delà de son rôle dans l'activité anti-tumorale des cellules NK, NKp30 joue un rôle unique parmi les NKR activateurs, car il peut cibler des cellules non transformées ; il est impliqué dans l'interaction entre les cellules NK et les DC. Les cellules NK peuvent ainsi induire la maturation (mécanisme dépendant du TNF) ou la lyse des iDC au travers de NKp30. C'est par ce même récepteur que les DC matures peuvent à leur tour moduler la maturation, la prolifération et l'activation des cellules NK (125) (voir partie précédente I-F). La nature du ligand impliqué sur les DC reste à déterminer.

L'expression du récepteur NKp30 est modulée par les cytokines environnantes. En effet, son expression est augmentée en présence d'IL-2 *in vitro* (311) et diminuée sous l'effet du TGF β 1, ce qui peut affecter les fonctions anti-tumorales ou de lyse des iDC des cellules NK (131). Les cellules leucémiques peuvent également induire une diminution de l'expression

de NKp30 et l'acquisition d'un phénotype NKp30^{dull} (mécanisme d'échappement tumoral à l'immunité) (161).

Le gène NCR3 codant le récepteur NKp30 est situé sur le bras court du chromosome 6 (locus 6p21.3), dans la région hautement polymorphes des gènes du CMH de classe III à proximité immédiate de plusieurs gènes à fonctions immunitaires comme le TNF ou la lymphotoxine. Il existe seulement à l'état de pseudogène dans la majorité des souches murines (à l'exception de la souche *Mus caroli*) (312). Le gène est cependant fonctionnel chez le rat et de nombreux autres mammifères (bœuf, chien, porc, lapin, éléphant, chauve-souris, etc). Des études d'homologie de structure ont révélé une identité de 25% entre NKp30 et CTLA-4, membre de la famille CD28 (contenant aussi PD-1 et ICOS) alors qu'avec les autres NCRs elle ne dépasse pas 15% (313).

On connaît 7 variants d'épissage de NCR3 dont 4 codants une protéine (<http://www.ensembl.org/>). Les trois premières protéines codantes, NKp30a, NKp30b et NKp30c (ou T1, T2 et T3 selon <http://vega.sanger.ac.uk>), se distinguent selon l'épissage alternatif de l'exon 4 (correspondant à la queue intra-cytoplasmique), tandis que la quatrième (T4, plus rare) diffère du fait de l'excision de 75 nucléotides au niveau de l'exon 2 (codant le domaine extra-cellulaire) (Fig.17). Les 3 isoformes de NKp30 classiquement étudiées (a, b et c ou T1, T2 et T3) (314) exercent différentes fonctions. NKp30a et NKp30b sont des isoformes immunostimulatrices, elles permettent l'induction de la production de cytokines de type « Th1 ». NKp30a est la seule isoforme à induire la cytotoxicité naturelle. Au contraire, NKp30c exerce une fonction immunosuppressive en induisant la sécrétion d'IL-10. Cette isoforme a d'ailleurs été associée à un mauvais pronostic chez des patients souffrant de sarcome gastro-intestinal et traités par imatinib (315).

L'hétérogénéité des isoformes NKp30 mène à l'hypothèse selon laquelle l'engagement de chaque molécule de NKp30 par des ligands variés va entraîner une activation différente des cellules NK. Cette hétérogénéité pourrait aussi être du fait de l'association avec différentes protéines de signalisation intra-cytoplasmique. Par ailleurs, un niveau supplémentaire de régulation pourrait découler de l'existence de plusieurs profils de glycosylation de NKp30 (312).

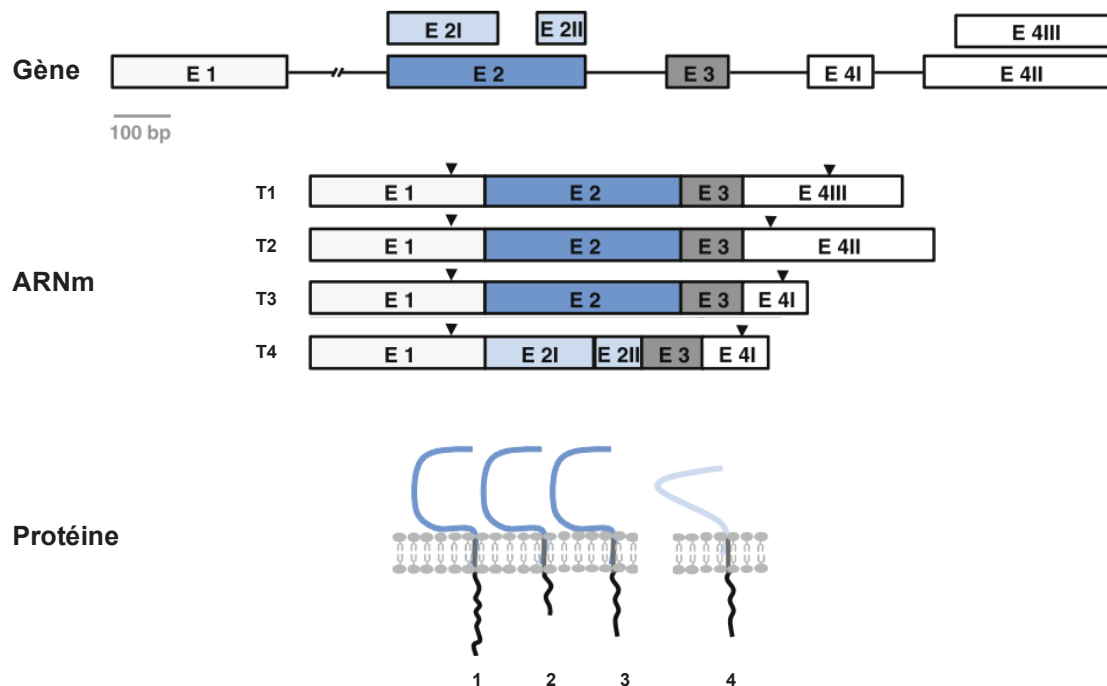


Figure 17 : NCR3, du gène à la protéine. Dans le schéma au niveau génomique, les rectangles correspondent aux exons et les traits séparant les exons correspondent aux introns, supprimés lors de l'épissage alternatif de l'ARN immature (inspiré de Kaifu T. et al., *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011).

NKp30 est exprimé à la surface des cellules NK quiescentes ou activées. Ce récepteur peut également être retrouvé sur des cellules T isolées à partir de sang de cordon ombilical après une stimulation par de l'IL-15 ou encore sur des cellules épithéliales endométriales exposées à la progestérone (300, 316). D'après D. Pende et al., les transcrits de NKp30 sont par ailleurs détectables dans différentes lignées leucocytaires tumorales, comme la lignée de cellules monoblastiques U937, la lignée de cellules T Jurkat, la lignée myéloïde UL-60 ou encore la lignée lymphocytaire B LCL (298).

L'expression des NCRs sur différents clones NK corrèle avec la capacité des cellules NK à lyser les cellules tumorales (317). Ceci démontre de façon indirecte que les ligands des NCRs sont probablement exprimés par de nombreuses cellules transformées.

Malgré cela, et bien que de nombreuses données suggèrent un rôle central de NKp30 dans l'immunosurveillance des tumeurs, le premier ligand identifié fût une structure virale. En effet, Tl. Arnon et al. ont mis en évidence l'effet inhibiteur de la protéine pp65 du virus HCMV sur la fonction NK après sa fixation sur NKp30 (189). Par ailleurs, PfEMP1, protéine caractéristique du parasite *Plasmodium falciparum*, est impliquée dans l'attaque des cellules NK médiée par NKp30 contre les érythrocytes infectés (318).

Par la suite, des ligands exprimés dans le cadre d'un stress cellulaire ont été identifiés. BAT-3 (pour « HLA-B-Associated Transcript 3 »), facteur nucléaire impliqué dans l'apoptose, peut être exposé de façon ectopique à la membrane plasmique de cellules transformées ou être

secrété sous l'effet d'un stress. Il peut alors se fixer à NKp30 et induire une réponse NK (319). BAT-3 a également été retrouvé à la membrane des exosomes excrétés par les DC et pourrait dans ce cas jouer un rôle critique dans l'interaction NK/DC (320).

Récemment, un nouveau membre de la famille B7, B7-H6, a été identifié par homologie de structure du gène mais également par similarité entre l'interaction B7-H6/NKp30 (sur les cellules NK) avec celle de B7.1 ou B7.2 avec CTLA-4 ou CD28 (régulant l'activation des LT). Le gène de B7-H6 est situé sur le chromosome 11. C'est une structure très conservée entre les mammifères. Comme tous les membres de la famille B7, B7-H6 comporte deux domaines de type Ig dans sa portion extra-cellulaire (313). Cette molécule est absente des cellules normales, mais est retrouvée à la surface de nombreuses lignées tumorales d'origines tissulaires variées, telles que des lymphomes, des mélanomes ou encore des carcinomes. L'engagement de NKp30 par B7-H6 induit l'activation des cellules NK aboutissant à la lyse des cellules cibles (312, 321). De façon similaire à NKp30, et en contraste avec les autres membres de la famille B7, un gène fonctionnel de B7-H6 manque dans l'espèce *Mus musculus*. B7-H6 représente un exemple de ligand de reconnaissance du soi induit par le stress. Les mécanismes induisant son expression à la surface des cellules tumorales (ligands génotoxiques, cytokines, inhibiteurs de protéasome...) restent pour le moment inconnus (312).

L'analyse détaillée de l'interaction de NKp30 avec son ligand B7-H6 par Li Y. et al. (313) révèle que l'interface de fixation du ligand est formée par les feuillets β (F et C) antérieur et postérieur du domaine Ig de type C extra-cellulaire de NKp30 avec le feuillet β antérieur du domaine de type V de B7-H6. Bien que des homologies de structures aient été constatées entre NKp30 et CTLA-4 ou PD-1 l'organisation du complexe NKp30/B7-H6 diffère considérablement de celle de PD-1/PD-L1 ou B7.1/CTLA-4. Douze résidus de NKp30 entrent en contact avec 11 résidus de B7-H6 au moyen d'interactions principalement hydrophobes.

	Position génomique	Structure 3D extracellulaire	Expression	Adaptateur	Ligands
NKp46	Chr. 19 - LRC	2 domaines Ig	NK quiescentes et activées	CD3 ζ /FcR γ	HA, Vimentine
NKp44	Chr. 6 - CMH classe III	1 domaine Ig	NK activées seulement	DAP12	HA, mycobactéries
NKp30	Chr. 6 - CMH classe III	1 domaine Ig	NK quiescentes et activées	CD3 ζ /FcR γ	pp65, PfEMP1, BAT-3, B7-H6

Tableau 3 : Divergences entre les 3 membres de la famille NCR. Ces récepteurs sont en effet liés par leur profil d'expression et leur fonction.

Il est à noter que dès que débute l'interaction entre une cellule NK et sa cellule-cible, se forme un complexe de molécules hautement organisées, dans la zone de contact entre les deux cellules, appelée synapse immunologique des cellules NK. Ces molécules incluent des NKRi inhibiteurs qui évaluent la présence du CMH de classe I à la surface de la cellule-cible (KIRs), des NKRa activateurs reconnaissant des ligands de type CMH ou non (NKG2D, 2B4, ...), des protéines du cytosquelette (actine β , taline...) et des intégrines (CD11a et b). La distance récepteur-ligand pour NKp30/B7-H6, KIR/HLA-C et NKG2D-MICA est approximativement la

même. Ces paires de récepteur-ligand peuvent donc colocaliser dans la zone centrale de la synapse immune (Fig. 18). Les cellules tumorales exprimant à la fois MICA et B7-H6 doivent donc probablement pouvoir engendrer un signal d'activation synergique des cellules NK. Ceci constitue un autre point indispensable à développer pour améliorer l'élimination des tumeurs.

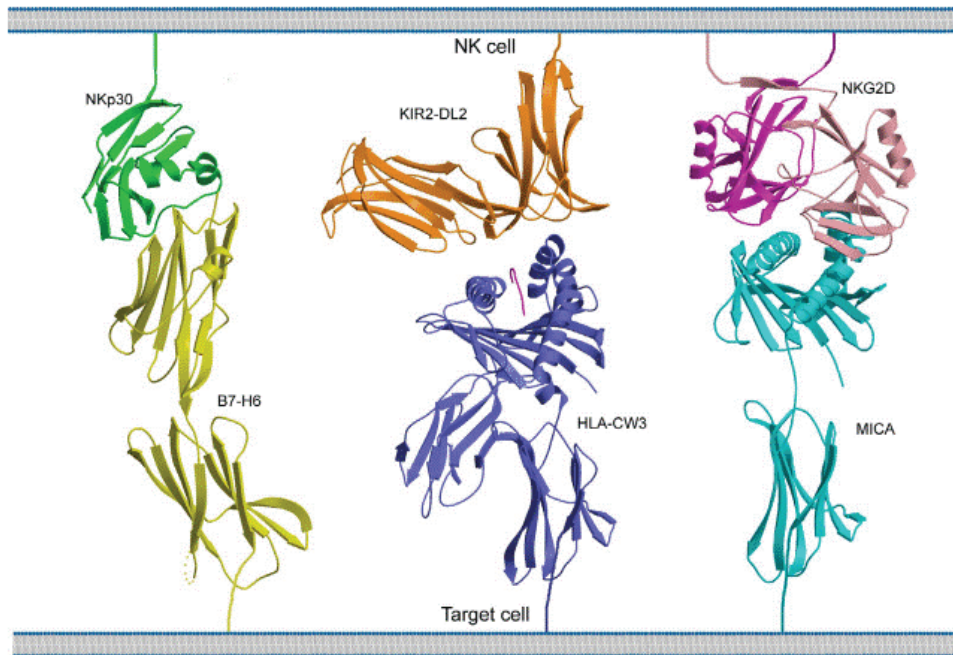


Figure 18 : Modèle hypothétique d'interaction entre cellule NK et cellule-cible au niveau de la synapse immunologique (schéma extrait de Li Y. et al., *J.Exp.Med.*, 2011).

Peu d'informations existent concernant la nature des ligands des NCRs. Par ailleurs, l'importance de NCRs dans l'activation de la fonction NK atteste de la nécessité d'identifier précisément leurs ligands pour déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques.

H) 6. Les corécepteurs impliqués dans la cytotoxicité des cellules NK

Des molécules additionnelles semblent également être importantes dans l'activation de la fonction NK, parmi lesquelles on peut citer DNAM-1, NKp80, 2B4 et NTB-A (Fig. 19). Ces molécules sont considérées comme des co-récepteurs car leur effet sur la fonction NK dépend d'une stimulation concomitante d'autres récepteurs activateurs des cellules NK.

DNAM-1 (DNAX Accessory Molecule -1), ou CD226, est une molécule d'adhésion leucocytaire impliquée dans la phase inductrice de l'activation NK. Le gène codant DNAM-1 est retrouvé sur le chromosome 18 et est exprimé dans les cellules NK, les LT et les monocytes. Sa structure est composée d'une portion extracellulaire comprenant deux domaines type Ig, d'une partie transmembranaire et d'une queue cytoplasmique contenant

3 résidus tyrosine. En réponse à la fixation de son ligand, les tyrosines du récepteur DNAM-1 sont phosphorylées et la cytotoxicité NK déclenchée. De façon intéressante, l'expression de DNAM-1 est dépendante de celle de LFA-1 (pour « lymphocyte function associated-antigen 1 ; Fig. 19) (322).

Deux ligands de DNAM-1 ont été identifiés, le récepteur du poliovirus (PVR ou CD155) et la Nectine-2 (ou CD112). Ces molécules sont fortement exprimées par les lignées cellulaires tumorales d'origine épithéliale ou neuronale comme les carcinomes, les mélanomes et les neuroblastomes (323). En association avec les récepteurs NCRs ou NKG2D, DNAM-1 est impliqué dans la reconnaissance et la lyse de différents types de cellules cancéreuses, comme le myélome (324), le mélanome (325) ou le cancer des ovaires (326). Son rôle dans l'immunité anti-tumorale est important dans le cas où les ligands pour les autres récepteurs activateurs sont peu exprimés (327). Dans le cadre du cancer des ovaires, l'expression de DNAM-1 est réduite et l'interaction directe avec son ligand PVR ne semble pas diminuer son expression (328). Une diminution de l'expression de DNAM-1 a été mise en évidence dans des patients LAM (329) et dans le cadre du cancer du poumon (330).

NKp80 est un récepteur homodimérique de type lectine C exprimé à la surface de toutes les cellules NK quiescentes et activées et d'un sous-type de cellules T CD56⁺. Il s'agit d'un récepteur activateur de 80 kDa qui fixe le ligand AICL (pour « activation-induced C-type lectin »). Il participe à l'activation de la cytotoxicité NK contre les cellules myéloïdes, promeut le cross-talk entre NK et monocytes et augmente la réponse des LT CD8⁺ mémoire. La signalisation s'opère par un motif de type « hémi-ITAM » atypique et le recrutement de la kinase Syk (Fig. 19) (331, 332).

2B4 (ou CD244) et NTB-A sont des membres de la famille des récepteurs SLAM (pour signaling lymphocytic activating molecule), un sous-groupe de la famille des récepteurs CD2 de type Ig (333).

2B4 est exprimé par toutes les cellules NK humaines, une sous-population de LT, de basophiles et de monocytes. Son ligand est une molécule de surface ancrée par un motif glycosyl-phosphatidylinositol de la famille CD2 : CD48 (334). CD48 est retrouvé à la surface des leucocytes et son expression est augmentée dans les LB infectées par le virus d'Epstein-Barr (EBV). A la différence des ligands de tous les autres récepteurs activateurs des cellules NK, CD48 est aussi exprimé à la surface de cellules NK. Betser-Cohen et al. ont démontré que l'association du récepteur 2B4 avec des molécules de CMH de classe I protège les cellules NK d'une lyse entre elles (335).

NTB-A est impliqué dans des interactions homotypiques NTB-A/NTB-A (336).

L'engagement de 2B4 et NTB-A par leurs ligands respectifs induit une réponse cytotoxique des cellules NK (333).

Un rôle crucial des interactions 2B4/CD48 a été mis en évidence dans le contrôle de l'activation des cellules NK dans le cadre d'une incapacité à répondre à une infection EBV chez des patients souffrant du syndrome lymphoprolifératif lié à l'X, ou syndrome de Purtilo,

dû à une mutation délétère de la protéine SH2D1A/SAP (Src Homology 2 Domain-containing protein / SLAM-associated protein). L'interaction 2B4/CD48 induit alors un signal inhibiteur plutôt qu'activateur rendant impossible la lyse des cellules infectées par l'EBV par les cellules NK. Le signal inhibiteur est sans doute dû au manque de SH2D1A qui semble être en compétition avec les phosphatases SHP pour la fixation à la queue cytoplasmique de 2B4 (337). 2B4 aurait aussi un rôle inhibiteur dans les cellules NK immatures se différenciant à partir de précurseurs $CD34^+Lin^-$. Dans ce contexte, les molécules 2B4 semblent contrebalancer les signaux activateurs provenant de l'expression précoce de NCRs, prévenant ainsi la cytotoxicité naturelle durant le développement NK (338). De plus, un rôle similaire de 2B4 dans l'inhibition de la fonction NK (cytotoxicité et production de cytokines) a été décrit dans les cellules NK de la membrane déciduale (339).

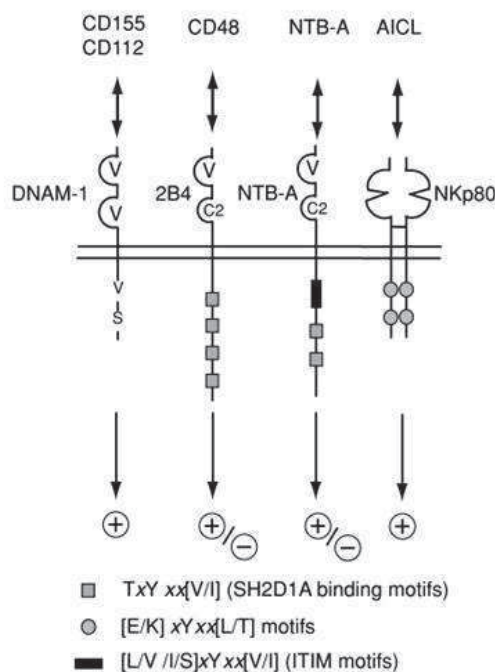


Figure 19 : Corécepteurs des cellules NK Humaines et leurs ligands cellulaires (schéma d'après R. Biassoni, *Current Protocols in Immunology*, 2009).

La capacité des cellules NK à tuer les cellules tumorales ou infectées par un virus est régulée par une balance entre récepteurs activateurs et inhibiteurs. Dans les conditions physiologiques, la fonction des récepteurs inhibiteurs prédomine sur celle des récepteurs activateurs permettant aux cellules NK d'épargner les cellules normales (295).

II – LA VARIABILITE INTERINDIVIDUELLE DANS L'ESPECE HUMAINE

La variabilité phénotypique interindividuelle dans l'espèce humaine est une expérience commune. Elle concerne des traits aussi courants que la couleur de la peau, la taille, ou la prédisposition à l'obésité mais aussi la susceptibilité à de nombreuses pathologies. Elle découle de modifications qui peuvent intervenir à toutes les étapes du fonctionnement cellulaire (Fig. 18). Un domaine très actif de la recherche actuelle est celui qui vise à mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent cette diversité. Ces mécanismes sont certainement nombreux et complexes et liés à la fois à l'environnement et au contexte génétique individuel. Les progrès technologiques extraordinaires de la génomique de ces dernières années ont permis d'accumuler une masse d'informations considérable sur la composante génétique.

A) Variabilité génétique

A) 1. Généralités

Le génome correspond à l'ensemble du matériel génétique d'un individu donné inscrit dans son ADN, polymère d'acides désoxyribonucléiques. Il contient en particulier tous les gènes, qui sont composés de séquences transcrites en ARN messagers (ARNm), presque toujours non contiguës, et dénommées exons ; séquences qui sont ensuite traduites en protéines. Chez les eucaryotes supérieurs, les exons sont interrompus par des séquences transcrites de façon seulement transitoire et absentes du messenger final, qu'on appelle introns. Le messenger final comprend donc une partie codante, traduite en protéine à l'aide du code génétique, flanquée de part et d'autre par les régions non traduites (UTR).

Le nombre de gènes est actuellement estimé à 23,000 chez l'homme. Ils ne sont cependant pas tous fonctionnels et sont alors appelés pseudogènes. Si un gène est le plus souvent défini comme le segment d'ADN qui détermine un phénotype ou une fonction associée à une molécule donnée, en l'absence de démonstration d'une fonction particulière, il peut être aussi caractérisé par homologie de sa séquence avec celle d'autres gènes, ou parties de gènes, dont la fonction est déjà connue. Un gène est orienté de son extrémité 5'UTR vers son extrémité 3'UTR. Il est précédé de son promoteur reconnu par l'ARN polymérase, enzyme réalisant la transcription du gène en ARN (Fig. 20). Enfin, des séquences régulatrices de l'expression génique (modulant l'interaction avec les protéines du complexe transcriptionnel) sont présentes de part et d'autre du gène, parfois à grande distance, mais aussi parfois dans le premier intron.

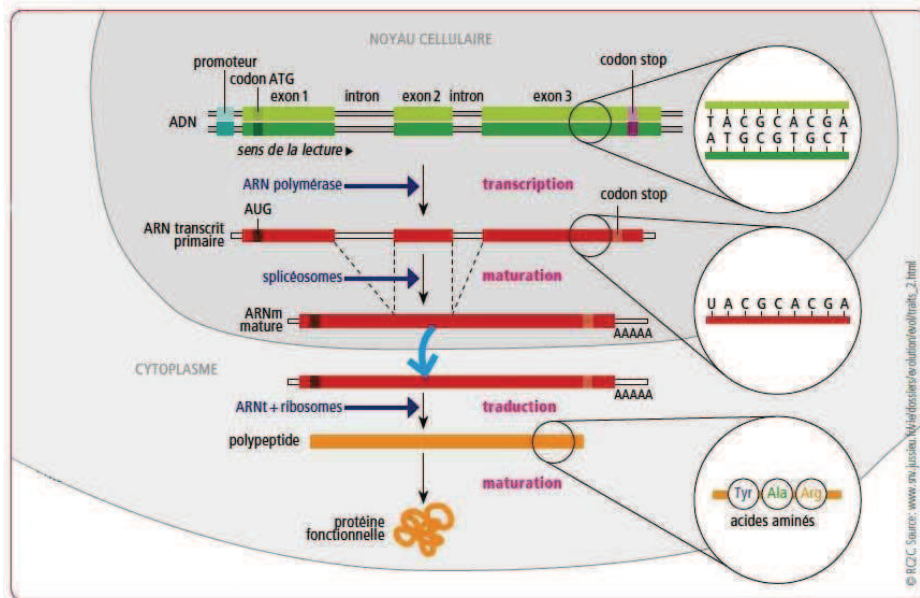


Figure 20 : Différentes étapes durant lesquelles peut se créer une nouvelle variabilité (schéma de M.Dion).

Bien que le génome soit dans l'ensemble extrêmement stable, il subit des changements, ou mutations, qui se traduisent par des modifications de la séquence d'ADN, et dont les conséquences fonctionnelles varient selon leur localisation. Leur fréquence est estimée à 1×10^{-8} par gène et par génération. Elle dépend de la taille du gène et parfois de l'existence de séquences fortement mutagènes ou "points chauds" de mutation. Les mutations représentent une des premières explications de l'existence d'une variabilité interindividuelle. Celles qui sont les moins favorables, voire délétères, à la survie de l'individu qui les acquiert, sont éliminées par le biais de la sélection naturelle, alors que les mutations avantageuses, plus rares, tendent à s'accumuler. La plupart des mutations sont dites neutres, elles n'influencent pas la valeur sélective et peuvent se fixer ou disparaître du fait de la dérive génétique. Les mutations spontanées, généralement rares et aléatoires, constituent la principale source de diversité génétique, moteur de l'évolution. Leurs causes restent encore mal connues.

Différents types de mutations peuvent être détectées : les mutations ponctuelles par substitution de paires de nucléotides ou les mutations par insertion ou délétion, pouvant entraîner un décalage du cadre de lecture.

Dans les mutations par substitution, un nucléotide est remplacé par un autre. Il peut s'agir de mutations de transition lorsqu'il y a substitution d'une base purique à une autre: Adénine (A) \leftrightarrow Guanine (G) ou d'une base pyrimidique à une autre: Thymine (T) \leftrightarrow Cytosine (C), ou d'une mutation de transversion, mutation causée par le remplacement d'une base purique par une base pyrimidique (ou inversement).

Ces mutations peuvent avoir diverses répercussions.

Les mutations « faux-sens » engendrent la modification de l'acide aminé codé par le triplet de nucléotide initial. Elles peuvent avoir une répercussion sur la structure et la fonction de la protéine produite par le gène.

Dans les mutations « non-sens », le changement d'un nucléotide provoque le remplacement d'un codon spécifiant un acide aminé par un codon-stop prématuré ce qui entraîne la production d'une protéine tronquée.

Lors d'une mutation dite silencieuse, la modification du nucléotide n'a pas de répercussion sur la séquence peptidique du fait de la redondance du code génétique (mutation synonyme: le nouveau triplet code le même acide aminé que le triplet original), ou parce qu'elle touche une région non codante de l'ADN. Cependant, à l'inverse, une mutation de la séquence non codante n'est pas toujours silencieuse. Elle peut, par exemple, changer un site d'épissage, ce qui peut se traduire par une délétion entière d'un exon ou décaler le cadre de lecture et affecter profondément la séquence peptidique.

Les mutations par insertion ou délétion consistent en l'ajout ou le retrait respectivement d'un ou plusieurs nucléotide(s) de la séquence d'ADN. Une addition ou une suppression de nucléotide(s) non multiple de 3 provoque un changement du cadre de lecture du code génétique. Au moment de la traduction, cela génère le plus souvent une protéine tronquée par l'apparition d'un codon-stop prématuré.

Certaines de ces mutations sont inscrites de façon stable dans la population et sont alors utilisées comme marqueurs génétiques de ces populations. Elles peuvent aussi et surtout être associées à des pathologies (sujet développé dans la section suivante).

On distingue deux grandes catégories de maladies à composante génétique : les maladies monogéniques/mendéliennes et les maladies complexes, multigéniques et multifactorielles.

Dans le cadre des maladies mendéliennes, généralement, une mutation induit une altération profonde de la fonction génique, avec un effet phénotypique fort. C'est par exemple le cas de la mucoviscidose où le gène CFTR, codant un canal ionique perméable au chlore, est muté. Ceci entraîne notamment des problèmes respiratoires et digestifs importants. Il existe une corrélation très forte entre la présence de la mutation et la survenue de la maladie.

Au contraire, dans les maladies complexes, qui sont de loin les plus fréquentes dans les pathologies humaines, le phénotype observé est la résultante de plusieurs mutations, chacune avec un effet faible. Ceci suggère que ces mutations ont des effets modérés sur la fonction du gène, ou affectent des régions régulatrices ou encore concernent des gènes appartenant à une famille multigénique dont les autres membres compensent la perte de fonction du gène muté. Ces maladies dépendent aussi généralement de facteurs environnementaux le plus souvent encore mal connus. Elles sont classiquement représentées par de nombreuses MAI ou des cancers.

Au-delà de l'effet modeste conféré par chacun des gènes sur le phénotype observé et de l'hétérogénéité génétique, un obstacle important à l'identification des gènes modifiés

associés à des maladies fréquentes réside dans la fréquence élevée des allèles morbides dans la population générale, il s'agit de l'hypothèse du variant commun pour une maladie commune (CVCD) (340). En alternative à cette hypothèse, les maladies complexes pourraient aussi reposer sur des allèles rares (341). Des variants rares (fréquence autour de 0,7% dans la population) du gène CARD15 sont ainsi impliqués dans l'étiologie de la maladie de Crohn (342). Ces variants rares sont d'ailleurs largement plus nombreux que les variants communs.

La génétique des maladies complexes connaît depuis ces dernières années une expansion considérable avec les études d'associations pangénomiques (sur tout le génome ou « Genome Wide Association Studies », GWAS). Ce type d'étude a permis de fournir de précieux renseignements sur les facteurs génétiques mis en jeu dans de nombreuses maladies multifactorielles telles que le diabète de type 2 (343), la PR (344) ou la maladie de Crohn (345). En dépit du grand nombre de mutations identifiées, ces études n'expliquent que partiellement la composante génétique du développement de ces maladies. Pour expliquer cette héritabilité manquante, sont invoqués d'autres types de facteurs génétiques comme les variants rares, ou les CNV (variation du nombre de copies), ainsi que des mécanismes d'interaction génique ou entre gènes et environnement ou, enfin, la mise en jeu de modifications épigénétiques.

A) 2. Les marqueurs de la variabilité génétique

La notion de « marqueur génétique » est associée à celle de variation de l'ADN. Ces marqueurs correspondent à des fragments d'ADN polymorphes qui définissent chacun un locus précis et unique au niveau du génome. Cette double propriété (spécificité de locus et polymorphisme) peut permettre d'identifier la transmission des allèles d'une région précise du génome au sein d'une même famille. Elle est également utilisée pour caractériser plus généralement les populations. Deux grands types de marqueurs sont utilisés dans les études génétiques : les microsatellites et, de façon désormais largement prédominante, les SNPs.

Les microsatellites sont des motifs courts de quelques nucléotides (de 2 à 5), répétés en tandem en nombre variable ("n" fois), d'où leur dénomination anglaise de « short tandem repeats » (STR). Les valeurs de "n" peuvent aller de quelques unités à plusieurs dizaines. Le polymorphisme associé à ce type de marqueur repose sur la variation du nombre de répétitions constituant le microsatellite. Ces marqueurs sont assez fréquents et uniformément répartis sur l'ensemble du génome (aux alentours de 1 tous les 50 kb). Environ $6,5 \times 10^5$ microsatellites sont dispersés dans le génome humain. Les marqueurs les plus couramment utilisés sont les microsatellites dus à des répétitions du dinucléotide « CA », généralement localisés dans les introns ou dans des séquences inter-géniques. Ces microsatellites sont souvent très polymorphes et donc très informatifs. Ils semblent résulter d'un glissement de l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN. Ces

microsatellites sont détectables par la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) suivi d'une électrophorèse distinguant les allèles par leur taille.

Ces marqueurs, à l'origine de la première cartographie du génome humain, ont permis d'identifier les gènes impliqués dans un grand nombre de maladies monogéniques (346).

Les marqueurs microsatellites, bien que aujourd'hui délaissés au profit des SNPs, offrent encore une alternative intéressante dans les études d'associations génétiques.

Les polymorphismes mono-nucléotidiques (ou « single-nucleotide polymorphism » - SNPs) sont des variations bi-alléliques d'un nucléotide dans la séquence d'ADN (347). Les fréquences des différents types de SNPs dans le génome ne sont pas les mêmes. En effet, les SNPs impliquant une transition de C en T sont les plus fréquents et constituent les 2/3 des SNPs (347).

Les SNPs communs, dont la fréquence de l'allèle mineur est supérieure à 2%, sont les marqueurs les plus utilisés dans les études génétiques actuelles. Ils sont très abondants dans le génome (environ $3 \cdot 10^7$, soit un SNP toutes les 100 à 300 pb) et sont souvent potentiellement fonctionnels contrairement aux marqueurs STR, sauf exception. Ils peuvent affecter l'expression d'un gène dans sa globalité (« expression Quantitative Trait Locus » ou eQTL) ou d'un exon particulier de ce gène (« splicing QTL » ou sQTL) dans le cas de variants non codants.

La stabilité de l'ARNm (avec apparition d'un codon stop prématuré induisant le mécanisme de dégradation des ARNm non-sens ou NMD pour « Nonsense Mediated Decay ») ou sa vitesse de traduction peuvent aussi être affectées. Les SNPs codants peuvent par ailleurs modifier la demi-vie d'une protéine, sa localisation (en jouant sur le domaine NLS ; « nuclear localization sequence »), ou encore modifier la fonction protéique.

Au total, plus de 10 millions de SNPs courants ont été identifiés chez l'Homme (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/whatishapmap.html.fr>). Néanmoins, il existe des variations de la répartition de ces SNPs au sein du génome. Ceux-ci sont en effet plus fréquents dans les introns et les régions inter-géniques que dans les exons. De plus, les SNPs synonymes sont plus fréquents que les SNPs non synonymes (ou « faux-sens ») (348). Dans près de 50% des cas, la fréquence des allèles mineurs dépasse 5%, indiquant que ces allèles n'exercent pas d'effet délétère fortement contre-sélectionné.

Le faible taux de mutations par génération des SNPs (10^{-8}), les caractérisant comme stables, ainsi que leur abondance dans le génome humain, permet leur utilisation dans différentes applications comme l'étude du déséquilibre de liaison (association préférentielle entre deux allèles en deux locus précis) et des haplotypes (combinaison d'allèles ayant des positions adjacentes sur un chromosome) au sein de régions génomiques ou l'étude de la diversité génétique des populations humaines et des espèces. Ils permettent ainsi de suivre les migrations d'une population, d'identifier des phénomènes de sélection positive et de préciser l'évolution des espèces. Ces polymorphismes constituent, de surcroît, un outil

exceptionnel pour l'identification des facteurs génétiques des maladies complexes par analyses d'associations.

Les SNPs concernent une variation entre deux allèles et sont donc moins polymorphes que les microsatellites multialléliques. Ils sont en revanche facilement identifiables par des techniques de séquençage (Sanger) ou de génotypage par sondes spécifiques avec la technologie Taqman. Des techniques d'analyse à haut débit sont couramment utilisées actuellement et consistent en l'analyse simultanée de centaines de milliers de SNPs grâce à des sondes spécifiques intégrées dans des puces à ADN (technologies Illumina® ou Affymetrix®).

Les SNPs fréquents ne sont probablement pas les seuls polymorphismes génétiques impliqués dans la pathogenèse des maladies multifactorielles (349). Des variants rares pourraient en outre jouer un rôle important dans ces maladies. Les mutations récurrentes du gène NOD2/CARD15 ont par exemple été associées à la maladie de Crohn (350). Des études ont également rapporté leur influence sur les caractères quantitatifs chez l'Homme (351) modulant l'expression globale d'un gène (eQTL) ou bien celle de certains exons (sQTL). De façon générale, le niveau d'expression des gènes (transcrits/variants alternativement épissés) est influencé par des polymorphismes *en cis*, c'est-à-dire situé sur le même chromosome. Dans certaines situations cependant des éléments de contrôle de l'expression d'un gène peuvent être situés sur un autre chromosome : *en trans*. Il s'agit là de l'effet de facteurs de transcription par exemple.

Un troisième marqueur génétique commence également à susciter un intérêt croissant depuis quelques années dans les études du développement de maladies monogéniques et multifactorielles et découle des variations du nombre de copies (CNVs).

A) 3. Bases de données et outils sur le génome humain

HapMap et 1000 Genomes

Différents projets internationaux, comme le projet HapMap (<http://www.hapmap.org/>) (352, 353), ont entrepris de recenser et valider dans différentes populations les SNPs déjà identifiés et de créer ainsi des cartes génomiques de haute densité, facilement accessibles sur des bases de données publiques comme NCBI (National Center for Biological Information). La base de données dbSNP, créée par NCBI, est d'ailleurs la principale et la plus complète base de données publique de polymorphismes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

Plus récent, le projet « 1000 génomes » a re-séquencé le génome entier de 1000 individus et a, de surcroît, largement contribué à l'identification de nouveaux SNPs (<http://www.1000genomes.org/>) (354).

Ensembl et UCSC

D'autres outils sont également largement utilisés pour l'obtention d'informations sur les gènes d'intérêt comme les sites Ensembl (www.ensembl.org) ou UCSC (University of California Santa Cruz, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

Ensembl et UCSC sont des « navigateurs génomiques » (ou « genome browsers ») qui rassemblent les séquences de référence et les annotations d'une grande collection de génomes, notamment du génome humain. Ces outils de navigation permettent de visualiser sur les cartes de chromosomes humains où sont localisés les différents gènes connus, les séquences de gènes prédits *in silico*, ainsi que les marqueurs génétiques. Ils fournissent par ailleurs des données sur l'expression des gènes et sur leurs homologues intra- et inter-espèces.

Désormais, ces nouvelles données, technologies et outils informatiques sont couramment utilisés et facilitent l'identification des facteurs génétiques potentiellement impliqués dans les maladies génétiques.

B) Variabilité post-transcriptionnelle

Le transcriptome est défini comme l'ensemble des transcrits (ou ARNm) présents dans une cellule ou un tissu particulier, à un moment donné et dans des conditions précises. Ainsi, le transcriptome correspond à une image de l'état fonctionnel du génome à un instant « t ».

L'ARN est une molécule informative unique caractérisée par sa séquence linéaire nucléotidique, aussi appelée structure primaire, et par la forme qu'elle va prendre avec la création de structures secondaires et tertiaires. En effet, le regroupement de deux Nt de l'ARN, situés à proximité, permet de former des structures secondaires telles que les structures en épingle à cheveux (Hairpin) ou tige-boucle (stem-loop). Il peut également y avoir des interactions entre des séquences de l'ARN plus éloignées et dans ce cas on parle de structures tertiaires de l'ARN. Les structures secondaires et tertiaires des ARN influencent les fonctions de la quasi-totalité des ARN dont les ARNm et les ARNs non-codants. Ces structures permettent à un ARN d'interagir avec lui-même, d'autres ARNs, avec des ligands ou avec des protéines fixant l'ARN (RBPs : RNA Binding Proteins). La plupart de ces structures exercent leur influence en fournissant des sites spécifiques de fixation des RBPs ou en empêchant la fixation de ces protéines en restreignant leur accès à l'ARN.

La structure de l'ARN influence donc sa transcription, son épissage, sa localisation cellulaire, sa traduction en protéine et son renouvellement.

La transmission de l'information de l'ADN à l'ARN, ou transcription, est un processus critique faisant intervenir différents mécanismes de régulation.

Le transcrit primaire, issu de la transcription colinéaire de l'ADN génomique en ARN sous l'action de l'ARN polymérase, subit une maturation consistant d'une part en la coupure du dernier exon et l'ajout d'une queue polyadénylée (généralement), d'autre part en l'ajout d'une coiffe méthylée en 5' et enfin en l'excision des introns et au raccordement des exons (épissage).

Epissage alternatif des ARN immatures

Le processus d'épissage fait intervenir des enzymes, les ribonucléoprotéines nucléaires, qui s'assemblent pour former le spliceosome et reconnaissent des structures consensus sur l'ARN immature. Les événements d'épissage peuvent se faire à des points de jonction différents pour un même gène, on parle alors d'épissage alternatif. Cet épissage alternatif, touchant 50 à 70% des pré-messagers, peut donner naissance à de multiples isoformes d'une même protéine (355, 356). Il est à noter que plus de 15% des mutations conduisant à des maladies génétiques humaines concernent un événement d'épissage (357).

Edition des ARN

Une autre modification post-transcriptionnelle peut intervenir lors de la maturation de l'ARN et consiste en un changement de la séquence de l'ARN dénommé « édition des ARNm ». Deux grands groupes d'enzymes réalisant ces modifications ont été décrites.

Les plus connues sont les enzymes ADARs (Adenosine Deaminases that Act on RNA) qui déaminent l'adénosine en inosine, laquelle est reconnue ensuite comme une guanine par la machinerie de traduction (transition A → G).

Le second groupe, constitué des APOBECs (Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme Catalytic polypeptide-like), édite une cytosine en uridine (transition C → U).

La séquence polypeptidique qui résulte de la traduction de ces ARNm ne correspond donc pas exactement à la séquence du gène correspondant.

MicroARN

D'autres facteurs peuvent réguler l'expression des gènes. En effet, récemment, le rôle d'ARN non traduits tels que les microARN (miRNA) a été invoqué dans la modulation de la transcription de gènes. Ces miRNA sont des ARN endogènes de courtes séquences (autour de 22 nucléotides) capables d'empêcher l'expression d'un gène en s'appariant à une séquence complémentaire de l'ARNm du gène cible. Le génome humain comprendrait environ 1000 gènes à l'origine de la transcription de miRNA (358), lesquels seraient abondants dans un grand nombre de types cellulaires et cibleraient environ 60% des gènes humains (359).

C) Autres niveaux de variabilité

C) 1. Modifications post-traductionnelles

L'ARNm obtenu à l'issue des mécanismes de maturation passe dans le cytoplasme de la cellule où il est traduit en une chaîne d'acides aminés (polypeptide) sous l'action d'un complexe ARNm - ribosomes - ARN de transfert.

Ce polypeptide subit à son tour des modifications pour devenir une protéine fonctionnelle. Peuvent en effet être ajoutés différents groupes fonctionnels chimiques à ce polypeptide comme un groupe acétyl (acétylation), alkyl (alkylation), isoprénoïde (isoprénnylation) mais aussi des peptides ou des protéines : on parle alors d'ubiquitination ou de sumoylation par exemple.

La nature chimique des acides aminés constituant la protéine peut aussi être modifiée par citrullination ou déamidation. Enfin, des ponts disulfures résultant de la liaison chimique entre deux cystéines peuvent s'ajouter aux changements de structure de la protéine.

Généralement ces modifications ont une répercussion sur la fonction de la protéine considérée, que ce soit au niveau de son action, de sa demi-vie, ou de sa localisation cellulaire.

C) 2. Autres mécanismes inducteurs de la variabilité interindividuelle

A côté des processus de régulation classiques cités précédemment, d'autres mécanismes récemment mis en évidence suscitent un intérêt croissant comme ceux qui régulent l'accessibilité de la chromatine aux facteurs de transcription ou encore l'épigénétique qui correspond à des variations de l'expression des gènes non codée par l'ADN comme les méthylations de l'ADN ou les modifications des histones.

Ces dernières années, les études d'associations pangénomiques (GWAS - genome wide association study) ont permis l'identification de centaines de variants génétiques associés à des maladies ou à des caractères complexes. Du fait des technologies disponibles, ces variants génétiques étudiés étaient principalement des variants dits communs et le plus souvent des polymorphismes bi-alléliques dont les allèles sont fréquents dans la population générale. En dépit d'efforts considérables, ces résultats n'expliquent que partiellement la très grande majorité des phénotypes analysés. Ceci reflète ce qui a pu être appelé « l'héritabilité manquante ». Pour l'expliquer, d'autres mécanismes génétiques sont désormais invoqués : rôle de variants rares, variations du nombre de copies de certains gènes ou séquences (CNV), interactions génétiques ou gènes-environnement, ou encore modifications épigénétiques.

Les phénotypes complexes sont la résultante de l'expression de multiples gènes avec différents niveaux de régulations et de variabilité, transcrits, protéine correspondante, et leur intégration dans les fonctions cellulaires et de l'organisme (comme par exemple dans les grandes voies de la réponse immunitaire). Les travaux réalisés jusqu'à présent se sont concentrés sur les bases génétiques de l'expression des gènes, au niveau des transcrits (totaux et/ou alternatifs) (360-362). Peu d'informations sont disponibles sur les étapes suivantes. L'an dernier cependant, une première étude pangénomique de paramètres métaboliques a montré que leur analyse génétique pouvait être raisonnablement envisagée (363).

Au niveau même des transcrits, beaucoup de progrès restent à faire. Récemment, l'analyse comparative de 2 types cellulaires, cellules B et monocytes purifiés, a montré que les contrôles génétiques peuvent varier entre les types cellulaires. En effet, BP. Fairfax et al. ont dressé en parallèle une carte de l'expression des gènes dans les LB et monocytes et ont pu identifier de nouveaux réseaux de gènes *trans*-régulés spécifiques d'un type cellulaire (ou de l'autre) (364) soulignant l'importance de travailler sur des populations enrichies dans la mesure du possible.

Par ailleurs, une des rares études cherchant à combiner la génétique à la transcriptomique, au métabolisme et à la biologie cellulaire sur les populations lymphocytaires T CD4⁺ et NK du sang périphérique d'individus sains caucasiens, a suggéré des corrélations entre différents paramètres biologiques tels que les hormones sexuelles ou le taux de sucre dans le sang et l'expression des transcrits, sans toutefois s'intéresser à la fonction précise de ces cellules dans l'immunité (365). Un grand intérêt de cette étude qui inclut plusieurs prélèvements plusieurs jours d'intervalle chez un même individu, a été de montrer que l'expression de nombreux transcrits était extrêmement stable dans le temps.

Mise à part la récente étude de N. Delahaye et al. dans le cadre de la réponse au traitement à l'imatinib de patients GIST (315), aucune étude n'a donc été réalisée sur la caractérisation de l'impact du polymorphisme des gènes caractérisant la population cellulaire NK, sur leur fonction.

Pourtant, les cellules NK représentent la troisième grande population lymphocytaire du sang périphérique humain et nous avons discuté son importance dans le bon fonctionnement du système immunitaire (dans les sections précédentes).

L'activation et la fonction des cellules NK dépendent de l'intégration des signaux émanant des récepteurs activateurs et inhibiteurs qu'elles expriment à leur surface. Cette réponse des cellules NK, après avoir été longtemps étudiée au travers du contrôle des récepteurs inhibiteurs KIRs repose aussi sur la mise en jeu des récepteurs activateurs comme NKG2D ou la famille des NCRs. Parmi ces NCRs, le membre NKp30 a été impliqué dans la réponse anti-tumorale avec notamment l'identification récente de son ligand, B7-H6 (321). NKp30 est, d'autre part, prépondérant dans l'interaction entre cellules NK et DC (144, 320). C'est par ce biais que la cellule NK peut induire la maturation des iDC ou leur lyse, ce qui peut par ailleurs avoir une répercussion sur le déroulement de la réponse immunitaire adaptative et donc sur la genèse des MAI.

Dans ce contexte, le travail que nous avons entrepris, dans une première partie, avait pour objectif, en prenant comme modèle la stimulation du récepteur NKp30, d'évaluer la variabilité inter-individuelle de la réponse des cellules NK et de chercher à corrélérer cette variabilité avec le niveau d'expression des transcrits NCR3 et de la protéine membranaire correspondante, au regard du polymorphisme génomique. Pour minimiser le bruit de fond, nous avons étudié une population de cellules primaires enrichies en lymphocytes NK à partir des cellules mononucléées du sang périphérique d'individus sains. L'étude d'individus sains permet de s'affranchir des effets dus à la pathologie elle-même ou aux traitements utilisés (chimiothérapie, anti-inflammatoires...) et est essentielle pour déterminer un cadre de référence pour l'étude ultérieure de cellules NK dans un contexte pathologique.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié le polymorphisme du récepteur NCR3 dans un contexte pathologique et plus précisément dans le cas de la myasthénie auto-immune. Nous avons réalisé une étude d'association de ce gène comme candidat dans la myasthénie auto-immune afin de déterminer les variants impliqués dans la pathologie et d'identifier des patients dont il serait intéressant d'approfondir le phénotype et la fonction des cellules NK.

RESULTATS

Article 1

Variability of NKp30/NCR3 expression impinges on cytotoxic function but not cytokine production of human NK cells

Nathalie Germaud, Giulia Fregni, Jean-Grégory Cormier, Anne Caignard, Henri-Jean Garchon.

(Soumis)

La variabilité de l'expression de NCR3/NKp30 affecte la fonction cytotoxique des cellules NK humaines mais pas la production de cytokines - Avant-propos

Objectifs :

Les cellules NK sont des lymphocytes de l'immunité innée caractérisés par leur activité cytotoxique spontanée envers les cellules modifiées. Elles jouent un rôle critique dans l'immuno-surveillance des tumeurs et dans l'immunité anti-virale. Ces cellules sont également capables de produire diverses cytokines et chimiokines et d'interagir avec les autres cellules du système immunitaire (DC, macrophage, LT) ce qui leur confère donc des propriétés immunorégulatrices. L'activation des cellules NK dépend de l'intégration de signaux émanant des différents récepteurs inhibiteurs (comme les KIRs) ou activateurs (NKG2D, NCRs) présents à leur surface. Parmi les NCRs, NCR3/NKp30 a récemment suscité un grand intérêt avec la découverte de son ligand B7-H6 exclusivement exprimé à la membrane de nombreuses cellules tumorales. Ainsi, NKp30 joue un rôle essentiel dans la lyse de certaines tumeurs. Il est également un intermédiaire important dans l'interaction cellules NK / DC aboutissant à la maturation ou à la lyse des iDC.

Comme la plupart des traits et phénotypes humains, la fonction des cellules NK est sujette à des variations interindividuelles. Une étude remarquable, réalisée par K. Imai et al. a par ailleurs démontré que l'activité des cellules NK était corrélée avec le risque de développer un cancer (154). Récemment, N.Delahaye et al. ont mis en évidence un SNP dans le gène NCR3 influençant l'épissage alternatif de son ARN et la réponse au traitement de patients atteints de sarcome gastrointestinal (GIST) (315).

Afin de mieux comprendre les conséquences fonctionnelles de la variabilité des réponses NK, il est essentiel d'étudier les cellules NK de sujets sains chez lesquels la fonction n'a pas été altérée par la tumeur elle-même ou par un traitement. Nous avons donc entrepris l'analyse de la réponse fonctionnelle des cellules NK après engagement de leur récepteur NKp30 au regard des transcrits et de deux polymorphismes de NCR3.

Démarche expérimentale :

Nous avons collecté des échantillons de sang périphérique de 43 donneurs sains à partir desquels nous avons d'une part extrait l'ADN génomique de ces individus et d'autre part enrichi la suspension cellulaire en lymphocytes NK par déplétion négative avec le kit RosetteSep. L'ADN des différents individus a été génotypé pour les SNPs NCR3 étudiés (rs986475 et rs11575836) par la technologie Taqman.

Sur ces cellules NK enrichies (2×10^4), nous avons déterminé le phénotype NKR activateur avec un marquage membranaire CD3 (-), CD56 (+), NKp30, NKp46, NKG2D par FACS.

Afin de déterminer l'activité fonctionnelle des cellules NK de chaque individu (1×10^5), nous avons stimulé ces cellules *in vitro* pendant 19h avec un anticorps monoclonal anti-NKp30

pré-fixé (ou son isotype contrôle) en présence ou non d'IL-2. Par la suite, les surnageants de ces cultures ont été récupérés et leur contenu en IFN γ , GM-CSF et TNF α déterminé par CBA alors que les cellules ont été marquées avec des anticorps pour évaluer l'expression de CD69 et CD107a (marqueur de dégranulation) par FACS.

Nous avons en parallèle extrait les ARN des cellules NK enrichies, réalisé leur transcription inverse en ADNc et évalué leur quantité relative par qPCR avec des amorces spécifiques de chacun des 4 transcrits NCR3 codants ainsi que des amorces détectant la totalité des transcrits NCR3 (voir tableau ci-dessous). Les résultats ont été normalisés au moyen de deux gènes de référence (ACTB et RPL30) et analysés par la méthode $\Delta\Delta C_q$.

Amorces	Sens	Séquence
Transcrits T1, T2, T3 NCR3	Sens	TGGAGAAAGAACATCCTCAGC
T1 NCR3	Antisens	CTTCCAGGTCAGACATTTGC
T2 NCR3	Antisens	TGGTGGAAAGGAAAGTTCAG
T3 NCR3	Antisens	TGAGGAGTGGCAGTGTGTTC
Tous transcrits NCR3	Antisens	GCTGAGGATGTTCTTTCTCCAC
T4 NCR3	Sens	GGGAAGGAGGCTGAGCTG
NCR3 T1, T2 & T3	Sens	CATGACCACCAGGCTGAG
Tous transcrits NCR3	Sens	GACGCCAGCATCTACGTGT
RPL30	Sens	CCTAAGGCAGGAAGATGGTG
	Antisens	AATGACCAATTTGCTTTGC
ACTB	Sens	GGACTTCGAGCAAGAGATGG
	Antisens	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG

Résultats :

Par cette étude, nous avons validé la remarquable association entre la présence de l'allèle mineur du SNP rs986475 et une augmentation de l'expression du transcrit 3 de NCR3 mis en évidence chez les patients GIST par l'équipe de L.Zitvogel. Nous avons également mis en évidence un autre SNP influençant le niveau des transcrits T1 de NCR3 : rs11575836 situé dans la région régulatrice du gène, en 5'UTR.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence plusieurs niveaux de corrélation entre le phénotype NKp30 et la réponse fonctionnelle des cellules NK à la stimulation ciblée de ce récepteur. En effet, l'expression initiale de NKp30 est corrélée avec celle du marqueur d'activation précoce CD69 ainsi qu'avec la fonction cytotoxique des cellules NK reflétée par l'externalisation de la molécule CD107a. Bien que l'expression de CD107a soit elle-même corrélée avec la production des cytokines (IFN γ , GM-CSF et TNF α), NKp30 n'est pas corrélée avec la fonction de production de cytokines. Ceci suggère l'existence de voies de signalisation différentes pour déclencher la cytotoxicité et la sécrétion de cytokines au sein des cellules NK.

Nous avons révélé l'intervention d'un autre facteur dans cette réponse fonctionnelle après engagement de NKp30 : NKp46. L'expression de NKp46 à la surface des cellules quiescentes corrèle en effet non seulement avec NKp30 mais aussi avec la réponse cytotoxique (et même de façon plus forte que NKp30 lui-même avec CD107a).

Enfin, grâce à un modèle de régression linéaire prenant en compte le facteur 'NKp46' (comme référence), nous avons pu constater une association modeste, mais significative et indépendante, entre les niveaux de transcrits T1 et T2 et la cytotoxicité NK en réponse à une stimulation ciblée de NKp30 en présence d'IL-2 ainsi qu'une association avec la présence de l'allèle mineur de rs11575836. Par contre, dans notre échantillon de donneurs sains, nous n'avons pas réussi à retrouver l'association entre le niveau de T3 ou le SNP rs986475 et cette même fonction NK mise en évidence chez les patients GIST.

**Variability of NKp30/NCR3 expression impinges on
cytotoxic function but not cytokine production of human NK
cells**

Journal:	<i>European Journal of Immunology</i> - 2
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Regular Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Germaud, Nathalie; Inserm, U1016 Fregni, Giulia; Inserm, U1016 Cormier, Jean-Gregory; Inserm, U1016 Caignard, Anne; Inserm, U1016 Garchon, Henri-Jean; Inserm, U1016
Keywords:	NK cells, Gene regulation, Cytokines, Cytotoxicity, NCR3/NKp30

SCHOLARONE™
Manuscripts

Variability of NKp30/NCR3 expression impinges on cytotoxic function but not cytokine production of human NK cells

Nathalie Germaud*, Giulia Fregni*[§], Jean-Grégory Cormier*, Anne Caignard*, Henri-Jean Garchon*

* Institut Cochin, CNRS UMR 8104; Inserm U1016; Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

[§]Present address: Institute of Pathology, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

Corresponding author: Dr Henri-Jean Garchon

Institut Cochin (Inserm U1016 ; CNRS UMR8104 ; University Paris Descartes), Bâtiment

Hardy A, Hôpital Cochin, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, FRANCE

Phone number: +33158413129

Fax number: +33140516641

e-mail address: henri-jean.garchon@inserm.fr

Keywords: Human NK cells, cytokines, cytotoxicity, cell activation, NCR3/NKp30, single nucleotide polymorphism, alternative splicing.

List of abbreviations :

NCR3, natural cytotoxicity receptor 3; SNP, single nucleotide polymorphism

Summary

The alternative splicing of NKp30 message was recently reported to alter the functional response of NK cells and prognosis in patients with gastrointestinal stromal tumors (GIST). In a series of 43 healthy blood donors, we examined the relationships between NCR3 transcript isoforms, NK phenotype, cytotoxic activity and cytokine secretion induced by ligation of NCR3/NKp30 on enriched NK cells. We found a strong correlation between NKp30 and NKp46 membrane expression and the cytotoxic response assessed with CD107a degranulation marker. Whereas levels of secreted cytokines (IFN γ , GM-CSF and TNF α) were tightly correlated between each other and with the cytotoxic response, they were uncorrelated with expression of NKp30, NKp46 and NKG2D activating receptors. We observed a strong association of the rs986475 SNP minor allele with increased levels of the T3 isoform of the NCR3 message but not with the functional response, contrary to a previous report. However, we identified a second SNP, rs11575836, that influences T1 transcript level in relation with the cytotoxic response elicited by NKp30 signaling. Our study unraveled specific patterns of gene expression in NK cells that independently control their cytotoxic and cytokine responses and warrant a comprehensive analysis of gene networks activated by NKp30 in light of genetic variability.

Introduction

Natural killer (NK) cells are a major subset of lymphoid cells characterized by their granular morphology and their spontaneous cytotoxic activity against modified cells [1, 2]. They play a critical role in the immune surveillance of tumors and in response to viral infections [3]. They are also able to produce a broad range of cytokines [4] and to interact with dendritic cells [5-7] and macrophages [8], endowing them with immunoregulatory properties [9]. As now well-documented for many human traits and phenotypes [10], the function of NK cells is subject to inter-individual variation. Importantly, there is epidemiological evidence that this inter-individual variation correlates to the risk of developing and/or controlling cancer [11]. Although very few studies have further addressed this issue of NK cell function activity among humans, it can be reasonably assumed that a better understanding of the molecular mechanisms underlying inter-individual variation would allow better prediction of individual cancer risk and therapeutic responses.

NK cell activation results from the engagement of cell-specific membrane receptors that collectively recognize a wide diversity of ligands [12]. Two main categories of these receptors are found at the NK cell surface, those that classically activate NK cells following binding to their ligands, such as the Natural killer Cytotoxicity Receptors (NCRs) [13-15] or Killer cell Lectin-like Receptor K1 (KLRK1/NKG2D) [16, 17] and those whose ligation instead prevents harmful activation against normal cells, most notably including the Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIRs) [18]. Among activating receptors, NCR3, also known as NKp30, has recently stimulated a growing interest because one of its ligand presently identified, B7-H6, appears to be expressed predominantly, if not exclusively, at the membrane of certain tumors [19-21]. This transmembrane receptor displays an extracellular domain with a typical immunoglobulin-like structure and a short intracellular tail capable of interacting

with CD3 ζ and Fc ϵ RI γ to signal cell activation following ligand binding [22-24]. Interestingly, the intra-cytoplasmic portion varies due to alternative splicing of the mRNA in a manner that was recently correlated with the therapeutic response of patients with gastrointestinal sarcoma tumors (GIST) [25]. Moreover, the pattern of NCR3 mRNA polyadenylation was found to be influenced by a single-nucleotide polymorphism (SNP) in the 3' untranslated region and correlated well with the cytotoxic response and the profile of cytokines secreted upon cell activation. Of note, NCR3 has been implicated in other cancers, including melanoma [26] and leukemias [27, 28], and in non tumoral pathologies, such as malaria [29], rheumatoid arthritis [30] and hepatitis C virus infection [31].

Taken together, these findings strongly suggest that variability of NK cell function results at least partly from genetic polymorphism. To assess the functional consequences of this variability, it is essential to study NK cells from healthy subjects, in whom function has not been altered by the tumor itself or by treatments, thus allowing establishment of reference patterns for gene expression and function. Since epidemiological data suggest that NK cells are an important component of the response to the carcinogenic process, the NK cell functional status in healthy subjects may also reflect a baseline that could critically orientate the subsequent disease course.

In the present study, to bring light on such complex mechanisms of immune cell regulation, we investigated the variability of NCR3 transcripts in relation with the gene polymorphism in 43 healthy blood donors and assessed how the transcript levels correlated with the NK cell function following ligation of NKp30.

Results

SNPs influencing NCR3 transcript levels

Based on the most recent annotation from VEGA (Vertebrate Gene Annotation), we set up quantitative PCR assays for each of the four known protein-encoding alternatively spliced transcripts of NCR3. T1, T2 and T3 isoforms result from alternative polyadenylation sites and modify the intracytoplasmic tail while T4 deletes a 25 amino acid peptide in the extra-cellular domain (supplementary Fig.1). We then assessed the relative variation of transcript levels in function of two SNPs, rs986475 and rs11575836. The former SNP maps to the 3' untranslated region and its minor allele was recently found to predict the response to treatment of GIST patients [25] while the latter SNP maps to the 5' untranslated region of the mRNA and has been associated with autoimmunity (Cormier J.-G., Germaud N. et al., in preparation). As shown in Fig. 1, we observed a substantial variability in the expression of T1, T2 and T3 isoforms, but not of T4, among the 43 blood donors. As previously reported in GIST patients, the rs986475 SNP influenced the levels of T3 very significantly. Subjects with the minor C allele had a 90% increase of T3 levels in average compared with those not carrying it ($p = 8 \times 10^{-10}$, Fig. 1A). Inversely, this allele was associated with a decrease of T1 and T2 levels while the overall level of NCR3 transcripts was not altered. The other SNP, rs11575836, was associated with a more modest but still significant increase of T1 transcripts (Fig. 1B). Finally, the protein expression measured by immunofluorescence at the NK cell membrane was correlated with the overall level of transcripts ($p=0.045$), but not with those of the isoforms that affect the cytoplasmic tail, T1, T2 and T3 (supplementary Fig. 2).

NCR3/NKp30 membrane expression levels affect the NK cell functional response

We then investigated the functional response of NK cells to NKp30 ligation in the presence of recombinant human interleukin-2 (rhIL-2). First, there was a marked correlation of the NKp30 membrane expression measured prior to stimulation with the induction of CD69, a nonspecific and early marker of lymphoid cell activation, following stimulation with anti-NKp30 antibody in presence of rhIL-2 (Fig. 2A). Interestingly, this correlation was also observed in samples activated with rhIL-2 alone (Fig. 2B). Of note, exposure to rhIL-2 alone resulted in a significant increase of the NKp30 surface expression and this was not an effect of cell culture (Fig. 2C). This suggests a positive feedback loop between NKp30 and early activation events in NK cells.

Concerning the functional responses, the cytotoxic potential of NK cells was assessed by immunofluorescence labeling of CD107a, while the cytokine production was tested by the quantification of IFN γ , GM-CSF and TNF α in culture supernatants. As shown in Fig. 3, there was a very significant correlation between the cytotoxic response and cytokine secretion. The most remarkable correlation, however, was noted between amounts of secreted IFN γ and GM-CSF (Fig. 4; $r = 0.81$, $p = 3.2 \times 10^{-8}$). Levels of TNF α were more loosely connected to both of these cytokines. These functional relationships were observed in response to either rhIL-2 alone (Fig. 4A) or to NKp30 ligation in presence of rhIL-2 (Fig. 4B).

After stimulation with anti-NKp30 antibody, NKp30 membrane expression could not be measured by immunofluorescence, likely because of masking by the pre-coated antibody or NKp30 internalization. We therefore indirectly evaluated the correlation of NKp30 expression with the functional responses by quantifying NKp30 *ex vivo* prior to stimulation (Fig. 5A) or following exposure to rhIL-2 alone (Fig. 5B). In both cases, NKp30 was correlated with CD107a expression. In contrast, the cytokine production was correlated modestly with NKp30 expression on rhIL-2 activated cells and not at all with NKp30 expressed on resting cells. Of

note, induction of CD69 was correlated with the cytotoxic response ($p=0.004$) but not with the cytokine secretion (supplementary Fig.3). Therefore, although CD69 reflects the early activation status, it poorly predicts the pattern of activation at later stages. Altogether, these findings are consistent with a relationship between NKp30 and the cytotoxic response and suggest that diverging pathways trigger cytotoxic response and cytokine production following NKp30 ligation.

NCR1/NKp46 and KLRK1/NKG2D receptors

Our findings suggested that additional factors were involved in the modulation of the NK functional response to NKp30 triggering. Thus, we assessed the role of two other NK activating receptors, NCR1/NKp46 and KLRK1/NKG2D. Membrane expression of both receptors varied substantially among individuals (Fig. 6). It is of note that the expression level of NKp46 was closely correlated with that of NKp30 prior to activation ($p=0.0003$; Fig. 6A) and also with the cytotoxic response induced by NKp30 stimulation ($p=0.0005$; Fig. 6B). Remarkably, a bivariate model accounting for both NKp30 and NKp46 indicated that NKp46 superseded NKp30 and was the only significant factor explaining CD107a variation ($r = 0.67$, $p = 0.0005$; Table 1).

In contrast, NKG2D was poorly correlated with either NKp30 ($p=0.02$; Fig. 6C) or NKp46 (data not shown). Correlation of NKG2D with cytotoxicity did not reach significance (Fig. 6D). Similarly to NKp30, neither NKp46 nor NKG2D membrane expression influenced cytokine production in our culture conditions (data not shown).

Influence of NCR3 transcript levels and SNPs on NK cell function

We finally tested the relationship of NCR3 transcript isoform levels and polymorphisms with the cytotoxic function and the cytokine production after NK cell activation by NKp30

ligation. We considered linear regression models accounting for NKp46 surface expression level, used as a reference, and we added the relevant terms. We found a modest association of T1 and T2, but not T3 isoforms with CD107a expression induced by NKp30 ligation in presence of rhIL-2 (Table 1). Supplementary Figure 4 gives a graphical representation of the respective influences of T1/T2 NCR3 transcript levels and NKp46 membrane expression on CD107a labeling. Similarly, there was indication of an association of the rs11575836 minor allele with higher levels of CD107a externalization. However, this allele was carried by only two subjects. On the contrary, there was no effect of the rs986475 SNP on NK cell functions. The cytokine levels were not correlated with expression levels of any of the isoforms, notably including T3, or with both SNPs (data not shown).

Discussion

Inter-individual variation of NK cell function is likely to have important consequences with regard to individual susceptibility to several cancers, to infections and to inflammatory diseases. Gaining insight into this variability will require an understanding of the mechanisms that modulate gene expression in NK cells. Several important studies, initially using lymphoblastoid cell lines, have demonstrated that transcript levels of numerous genes indeed vary between individuals in a largely heritable manner [32, 33]. Moreover, for the majority of these genes, the genetic polymorphism that modifies the gene expression level appears to be located in *cis*, i.e. in the gene itself or in its flanking regulatory regions [34]. More recently, studies of nontransformed cells and tissues have largely corroborated these findings and revealed that the effect of most SNPs controlling gene expression was tissue- or cell-type specific. This appears to be the case even for closely related cell lineages, such as peripheral blood B-cells and monocytes [35]. For a number of genes, different SNPs thus appear to control gene expression in B cells and in monocytes. It was therefore important to investigate an enriched NK cell population to minimize confounding caused by cell types mixing in peripheral blood.

In the present study, we have focused our investigation on a single gene, NCR3, as opposed to a whole genome approach, but we have related the gene expression at the transcript level with that at the protein level and the NK function triggered by NKp30 ligation. We also considered alternative transcripts. Messenger splicing, alternative promoters and 3'untranslated regions represent critical mechanisms that modify the eventual gene function, especially in the immune system [36]. In our series of 43 healthy donors, we were able to confirm the very strong association of rs986475 with one of the transcript isoforms, which had been reported in GIST patients [25]. This SNP alters a typical polyadenylation site and seems to be the causative SNP that shifts NCR3 expression from the major T1 and T2 isoform

1
2
3
4 towards T3. In addition, we observed a modest but significant and new association between
5 the rs11575836 minor allele and the levels of the T1 isoform, both of which were correlated
6 with the cytotoxic function assessed by CD107a externalization following NKp30 ligation. It
7 will be essential to replicate these findings in an independent study. However, the
8 demonstration that the NKp30 isoform encoded by the T1 transcript is capable to trigger
9 cytotoxicity, by a still unknown mechanism, is remarkably consistent with our results [25].
10 The path linking the rs11575836 minor allele with the preferential splicing toward T1
11 message is also unclear at present. This SNP is in perfect linkage disequilibrium with another
12 SNP, rs11575842, located in the last intron of the NCR3 gene where it alters a putative
13 binding site for an RNA splicing factor, ASF2. Therefore, rs11575842 might be the causative
14 SNP influencing the choice of the last exon just downstream of it. Functional and molecular
15 studies will be necessary, however, to validate this hypothesis.

16
17 In contrast, we were not able to detect the inverse correlation of T3 isoform expression, or
18 the minor allele of rs986475, with the cytotoxic response and the production of TNF α ,
19 reported by Delahaye et al. [25]. The reasons for this discrepancy are unclear at present. In
20 both series of experiments, NK cells were enriched from peripheral blood and stimulated by
21 antibody-mediated ligation of NKp30 in the presence of rhIL-2. However, in this previous
22 study, patients, as opposed to healthy donors in ours, were investigated. Possibly, the disease
23 context allows for functional differentiation guided by the expression of the T3 isoform. The
24 immunosuppressive cytokine IL-10 could be an important element of this context as
25 suggested by the outcome of the IL-10-blocking experiment performed by Delahaye et al.
26 [25] and by its stimulatory effect on proliferation of the CD56^{bright} NK cells in combination
27 with IL-2 [37]. Interestingly, the latter study showed that secretion of cytokines including
28 IFN γ , GM-CSF and TNF α but not IL-10 itself was also enhanced by IL-10. In contrast, IL-10
29 secretion, which we did not detect in our experimental conditions (not shown), would depend

on both IL-2 and IL-12, at least in healthy donors [38], altogether stressing the importance of the cell context in the orientation of NK responses. Finally, the genetic polymorphism of the IL-10 gene promoter influences the gene expression and the clinical prognosis of several cancers [39].

The marked correlation of the NKp30 membrane expression with the cytotoxic response of NK cells in response to NKp30 ligation is a new finding. It is not trivial since NKp30 expression was poorly correlated with cytokine secretion and it is not explained by the variation of the proportion of CD56^{bright} NK cells among individuals. This minor subset of the circulating pool of NK cells has lower cytotoxic potential but produces greater amounts of cytokines than the CD56^{dim} NK cells [40]. However, we observed no correlation between the proportion of CD56^{bright} cells and CD107a expression or the amount of secreted cytokines (not shown). Remarkably, NKp30 was also strongly correlated with NKp46. The latter appeared to be the most relevant factor explaining CD107a level, at least on a statistical ground. In contrast, the membrane expression of NKG2D was poorly correlated to both NCRs and did not influence the cytotoxic response. Co-regulation of NCR1 and NCR3 expression might occur at the transcriptional level. However, examination of recent microarray data in public database [41] suggests this is unlikely as there was no correlation between transcript levels of NCR1 and NCR3 (supplementary Fig. 5). Very interestingly, the presence of a number of genes with transcript levels tightly correlated with those of NCR3 indicates the existence of a highly connected transcriptional network associated with NCR3. We therefore favor a posttranscriptional mechanism to explain the relationship between the cytotoxic response signaling by these two NCRs. This might implicate a role of CD3 ζ , a member of the CD3 family that, as a dimer, forms a complex with NKp30. CD3 ζ also combines as a monomer with NKp46, jointly with Fc ϵ RI- γ and Fc γ RIII [42]. A limiting amount of CD3 ζ might therefore result in fine adjustment of the membrane expression of NCR and subsequently

1
2
3
4 regulate the signal transduction pathway that, via SYK and ZAP70, activates the PI3 kinase
5 and the phosphorylation cascade that eventually elicits the cytotoxic response [43]. It might
6
7 also account for the weak correlation between transcript levels and membrane expression of
8
9 NKp30. The fact that NKG2D utilizes the DAP10 adaptor molecule instead of CD3 ζ may
10
11 explain the poor correlation of its expression level with those of the NCRs [44].
12
13
14

15
16 Secretion of cytokines following NKp30 ligation, including IFN γ , GM-CSF and to a lesser
17
18 extent TNF α , appears to obey a common control. Although it is also correlated to the
19
20 cytotoxic response, their underlying pathways are likely different since, unlike the cytotoxic
21
22 response, cytokine secretion is completely independent of NCR membrane expression levels.
23
24 This reveals another layer of complexity in gene expression patterns in NK cells and is
25
26 consistent with a recent study demonstrating that cytokines such as IFN γ and TNF α are
27
28 processed intracellularly and secreted along distinct paths than perforin [45]. This dissociation
29
30 between the cytotoxic and the cytokine responses may also reflect the existence of two main
31
32 NK cell subsets with functional specialization, the CD56^{dim}CD16^{high/pos} NK cells being
33
34 involved in cytotoxicity while the CD56^{bright}CD16^{low/neg} NK cells have low cytotoxic activity
35
36 but are able to produce various immunoregulatory cytokines [40]. Interestingly, CD3 ζ
37
38 message was found at significantly higher levels in CD56^{dim} NK cells compared to CD56^{bright}
39
40 cells [46], comforting the correlation of NKp30, NKp46 expression and the cytotoxic
41
42 response we observed.
43
44
45

46
47 Our analysis of inter-individual variability patterns in donor blood NK cells revealed
48
49 significant quantitative associations between expression level of NCR3 and the NCR3-
50
51 triggered cytotoxic response. These associations appear to involve both transcriptional and
52
53 posttranscriptional mechanisms. They warrant a comprehensive analysis of gene networks
54
55 activated in NK cells by NKp30 and other NK receptors in light of human genetic variability.
56
57
58
59
60

Materials and Methods

Collection of samples and NK cell preparation

Peripheral blood samples (15 to 17 ml in EDTA collection tubes) were harvested from healthy donors by the Saint-Vincent-de-Paul blood bank after written informed consent, in agreement with the Declaration of Helsinki. Forty-three individuals were recruited at random, including 21 women and 22 men aged from 19 to 62 years old (mean/median: 40 years). A one-step immunoselection kit based on negative selection with antibodies against non-NK cells (CD3, CD4, CD19, CD36, CD66b; RosetteSep™; Stem Cell technologies) was used to enrich NK cells to a purity of 73.4 ± 7.8 % of CD3⁺CD56⁺ cells.

NK cell phenotyping

Enriched NK cells (2×10^4) were characterized *ex vivo* by multicolor flow cytometry analysis using a combination of monoclonal antibodies (mAb), CD3-AmCyan (clone SK7), CD56-AlexaFluor 488 (clone B159), NKp46-V450 (clone 9E2/Nkp46), NKG2D-APC (clone 1D11; all provided by BD Biosciences), NKp30-PE (clone Z25; Beckman Coulter), or their control isotypes, for 20 to 30 min at 4°C, washed and then fixed in 2% paraformaldehyde. Data were acquired on a FACSCanto II with Diva software (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software version 7.6.4 (Treestar). The percentages of positive cells and mean fluorescence intensities were determined based on at least 6,000 NK-gated events defined as CD3⁺CD56⁺ lymphocytes.

NK cell function analysis

Enriched NK cells (1×10^5) were cultured overnight in 96-flat bottom plates precoated with anti-NKp30 mAb (5 µg/ml; clone 210845; R&D systems), in RPMI Medium 1640 - GlutaMAX™-I (GIBCO, Life technologies™) supplemented with 10% FCS,

penicillin/streptomycin (100 U/ml and 100 µg/ml respectively) and in certain conditions with rhIL-2 (10 ng/ml, coming from Dr Chiron's laboratory-USA) at 37°C and 5% CO₂. The control IgG_{2a} isotype (5 µg/ml; clone 133304; R&D systems) for the anti-NKp30 mAb was systematically included in control cultures. In the text, however, these are referred to as "medium" or "IL-2 alone" for reason of clarity. The dose (5 µg/ml) of anti-NKp30 mAb was selected based on a pilot experiment and is commonly used in the literature. Then NK cells were harvested and stained with functional markers: CD69-FITC (clone L78) and CD107a-V450 (clone H4A3; BD Biosciences/Pharmingen), or their control isotypes. Supernatants were tested for the presence of IFN γ , GM-CSF and TNF α soluble molecules by Cytometric Binding Array (CBA; BD Biosciences) with a CBA Flex Set. Data for functional markers and cytokine secretions were acquired on a FACSCanto II using FACS Diva software (BD Biosciences). Functional markers were evaluated with FlowJo software (percentages of positive cells and mean fluorescence intensities), cytokines with the BD FCAP Array™ Software version 3.0 (more than 2,000 events were analyzed in each test).

RT-PCR analysis for NCR3 transcripts

Total RNA was isolated from enriched NK cells with the RNeasy mini or micro kit in relation with cell numbers and according to manufacturer's instructions (QIAGEN). RNA quality was asserted with an Agilent 2100 bioanalyzer and was appropriated for qPCR use, with RNA Integrity Number (RIN) of 8.4 ± 1.1 (mean \pm s.d.). RNA was reverse-transcribed to cDNA using the SuperScript II Reverse transcriptase (200 U; Invitrogen) in a final volume of 20 µl. 2,5 µl of cDNA (0,25 ng/µl) were amplified with primers specific for the four known NCR3 coding transcripts, for all NCR3 transcripts and for two reference gene transcripts: RPL30 and β -actin (ACTB) in a final volume of 10 µl with LightCycler® 480 SYBR Green I Master mix (Roche). Primer pairs were designed using Primer3 software with at least one of

1
2
3
4 them overlapping 2 exons to avoid genome DNA amplification (supplementary Fig.1). Primer
5 sequences are available upon simple written request. cDNA amplifications were carried out
6 and analyzed in a Taqman 7300 system (Applied Biosystems; Life technologies™). Obtained
7 data were analyzed using the ΔC_q method.
8
9
10
11
12

13 14 15 *NCR3 SNP genotyping* 16

17 DNA was isolated from whole blood according to the DNeasy kit protocol (QIAGEN). It
18 was diluted in DNase free water at a concentration of 5 ng/ml to be genotyped for NCR3
19 SNPs using a custom TaqMan® SNP Genotyping Assay (pre-designed primers and Taqman
20 genotyping Master Mix) in 96-well plates that were read and analyzed using the 7300 Real-
21 time PCR system (Applied Biosystems; Life technologies™).
22
23
24
25
26
27
28
29

30 31 *Statistical analysis* 32

33 Statistical tests and graphics were generated by PRISM 5 (GraphPad Software Inc.) and R
34 software. Nonparametric Mann-Whitney test was used to compare trait distribution between
35 allele carrier groups. Nonparametric Spearman test was done to test correlation between data.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47 **Acknowledgements** 48

49 The authors thank Muriel Andrieu from the cytometry and immunobiology platform and
50 Franck Letourneur from the genomics platform (Institut Cochin).
51
52
53
54

55 **Conflicts of interest** 56

57 None to be declared
58
59
60

References

- 1 Trinchieri, G., Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989. **47**: 187-376.
- 2 Becknell, B. and Caligiuri, M. A., Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol* 2005. **86**: 209-239.
- 3 Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. and Ugolini, S., Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008. **9**: 503-510.
- 4 Robertson, M. J. and Ritz, J., Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990. **76**: 2421-2438.
- 5 Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L. and Vivier, E., Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 2005. **106**: 2252-2258.
- 6 Simhadri, V. R., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Topolar, D., Simhadri, V. L., Nohroudi, K., Kufer, T. A., Engert, A. and Pogge von Strandmann, E., Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS One* 2008. **3**: e3377.
- 7 Moretta, L., Ferlazzo, G., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Mingari, M. C. and Moretta, A., Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev* 2006. **214**: 219-228.
- 8 Nedvetzki, S., Sowinski, S., Eagle, R. A., Harris, J., Vely, F., Pende, D., Trowsdale, J., Vivier, E., Gordon, S. and Davis, D. M., Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* 2007. **109**: 3776-3785.
- 9 Martin-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F., Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 2004. **5**: 1260-1265.
- 10 Cookson, W., Liang, L., Abecasis, G., Moffatt, M. and Lathrop, M., Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nat Rev Genet* 2009. **10**: 184-194.
- 11 Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K. and Nakachi, K., Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000. **356**: 1795-1799.
- 12 Lanier, L. L., NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005. **23**: 225-274.
- 13 Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L. and Moretta, A., p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* 1997. **186**: 1129-1136.
- 14 Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L. and Moretta, A., Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 1999. **190**: 1505-1516.
- 15 Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L. and Moretta, A., NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 1998. **187**: 2065-2072.
- 16 Houchins, J. P., Yabe, T., McSherry, C. and Bach, F. H., DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 1991. **173**: 1017-1020.
- 17 Cerwenka, A. and Lanier, L. L., Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol Rev* 2001. **181**: 158-169.
- 18 Moretta, L. and Moretta, A., Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2004. **16**: 626-633.
- 19 Brandt, C. S., Baratin, M., Yi, E. C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C. D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E. and Levin, S. D., The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med* 2009. **206**: 1495-1503.

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5 20 Kaifu, T., Escaliere, B., Gastinel, L. N., Vivier, E. and Baratin, M., B7-H6/NKp30
- 6 interaction: a mechanism of alerting NK cells against tumors. *Cell Mol Life Sci* 2011. **68**:
- 7 3531-3539.
- 8 21 Li, Y., Wang, Q. and Mariuzza, R. A., Structure of the human activating natural cytotoxicity
- 9 receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6. *J Exp Med* 2011. **208**: 703-714.
- 10 22 Anderson, P., Caligiuri, M., Ritz, J. and Schlossman, S. F., CD3-negative natural killer
- 11 cells express zeta TCR as part of a novel molecular complex. *Nature* 1989. **341**: 159-162.
- 12 23 Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. C. and Moretta, L., Natural
- 13 cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 2000.
- 14 **21**: 228-234.
- 15 24 Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., Biassoni, R.
- 16 and Moretta, L., Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-
- 17 mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001. **19**: 197-223.
- 18 25 Delahaye, N. F., Rusakiewicz, S., Martins, I., Menard, C., Roux, S., Lyonnet, L., Paul, P.,
- 19 Sarabi, M., Chaput, N., Semeraro, M., Minard-Colin, V., Poirier-Colame, V., Chaba, K.,
- 20 Flament, C., Baud, V., Authier, H., Kerdine-Romer, S., Pallardy, M., Cremer, I.,
- 21 Peaudecerf, L., Rocha, B., Valteau-Couanet, D., Gutierrez, J. C., Nunes, J. A., Commo,
- 22 F., Bonvalot, S., Ibrahim, N., Terrier, P., Opolon, P., Bottino, C., Moretta, A., Tavernier,
- 23 J., Rihet, P., Coindre, J. M., Blay, J. Y., Isambert, N., Emile, J. F., Vivier, E., Lecesne,
- 24 A., Kroemer, G. and Zitvogel, L., Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis
- 25 of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med* 2011. **17**: 700-707.
- 26 26 Pietra, G., Manzini, C., Rivara, S., Vitale, M., Cantoni, C., Petretto, A., Balsamo, M.,
- 27 Conte, R., Benelli, R., Minghelli, S., Solari, N., Gualco, M., Queirolo, P., Moretta, L. and
- 28 Mingari, M. C., Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the
- 29 expression of activating receptors and cytolytic activity. *Cancer Res* 2012. **72**: 1407-1415.
- 30 27 Costello, R. T., Sivori, S., Marcenaro, E., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M. J.,
- 31 Reviron, D., Gastaut, J. A., Pende, D., Olive, D. and Moretta, A., Defective expression and
- 32 function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia.
- 33 *Blood* 2002. **99**: 3661-3667.
- 34 28 Costello, R. T., Knoblauch, B., Sanchez, C., Mercier, D., Le Treut, T. and Sebahoun, G.,
- 35 Expression of natural killer cell activating receptors in patients with chronic lymphocytic
- 36 leukaemia. *Immunology* 2012. **135**: 151-157.
- 37 29 Delahaye, N. F., Barbier, M., Fumoux, F. and Rihet, P., Association analyses of NCR3
- 38 polymorphisms with *P. falciparum* mild malaria. *Microbes Infect* 2007. **9**: 160-166.
- 39 30 Mulcahy, H., O'Rourke, K. P., Adams, C., Molloy, M. G. and O'Gara, F., LST1 and
- 40 NCR3 expression in autoimmune inflammation and in response to IFN-gamma, LPS and
- 41 microbial infection. *Immunogenetics* 2006. **57**: 893-903.
- 42 31 Golden-Mason, L., Cox, A. L., Randall, J. A., Cheng, L. and Rosen, H. R., Increased
- 43 natural killer cell cytotoxicity and NKp30 expression protects against hepatitis C virus
- 44 infection in high-risk individuals and inhibits replication in vitro. *Hepatology* 2010. **52**: 1581-
- 45 1589.
- 46 32 Morley, M., Molony, C. M., Weber, T. M., Devlin, J. L., Ewens, K. G., Spielman, R. S.
- 47 and Cheung, V. G., Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression.
- 48 *Nature* 2004. **430**: 743-747.
- 49 33 Cheung, V. G., Conlin, L. K., Weber, T. M., Arcaro, M., Jen, K. Y., Morley, M. and
- 50 Spielman, R. S., Natural variation in human gene expression assessed in lymphoblastoid
- 51 cells. *Nat Genet* 2003. **33**: 422-425.
- 52 34 Cheung, V. G., Spielman, R. S., Ewens, K. G., Weber, T. M., Morley, M. and Burdick, J.
- 53 T., Mapping determinants of human gene expression by regional and genome-wide
- 54 association. *Nature* 2005. **437**: 1365-1369.
- 55 35 Fairfax, B. P., Makino, S., Radhakrishnan, J., Plant, K., Leslie, S., Diltthey, A., Ellis, P.,
- 56 Langford, C., Vannberg, F. O. and Knight, J. C., Genetics of gene expression in primary
- 57 immune cells identifies cell type-specific master regulators and roles of HLA alleles. *Nat*
- 58 *Genet* 2012. **44**: 502-510.
- 59
- 60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
- Lynch, K. W., Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004. **4**: 931-940.
- Carson, W. E., Lindemann, M. J., Baiocchi, R., Linett, M., Tan, J. C., Chou, C. C., Narula, S. and Caligiuri, M. A., The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood* 1995. **85**: 3577-3585.
- Mehrotra, P. T., Donnelly, R. P., Wong, S., Kanegane, H., Geremew, A., Mostowski, H. S., Furuke, K., Siegel, J. P. and Bloom, E. T., Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. *J Immunol* 1998. **160**: 2637-2644.
- Wang, Y. C., Sung, W. W., Wu, T. C., Wang, L., Chien, W. P., Cheng, Y. W., Chen, C. Y., Shieh, S. H. and Lee, H., Interleukin-10 haplotype may predict survival and relapse in resected non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2012. **7**: e39525.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Turner, S. C., Chen, K. S., Ghaheri, B. A., Ghayur, T., Carson, W. E. and Caligiuri, M. A., Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001. **97**: 3146-3151.
- Gruden, K., Hren, M., Herman, A., Blejec, A., Albrecht, T., Selbig, J., Bauer, C., Schuchardt, J., Or-Guil, M., Zupancic, K., Svajger, U., Stabuc, B., Ihan, A., Kopitar, A. N., Ravnikar, M., Knezevic, M., Rozman, P. and Jeras, M., A "crossomics" study analysing variability of different components in peripheral blood of healthy caucasoid individuals. *PLoS One*. **7**: e28761.
- Djeu, J. Y., Jiang, K. and Wei, S., A view to a kill: signals triggering cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 2002. **8**: 636-640.
- Augugliaro, R., Parolini, S., Castriconi, R., Marcenaro, E., Cantoni, C., Nanni, M., Moretta, L., Moretta, A. and Bottino, C., Selective cross-talk among natural cytotoxicity receptors in human natural killer cells. *Eur J Immunol* 2003. **33**: 1235-1241.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A. B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L. L. and Phillips, J. H., An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999. **285**: 730-732.
- Reefman, E., Kay, J. G., Wood, S. M., Offenhauser, C., Brown, D. L., Roy, S., Stanley, A. C., Low, P. C., Manderson, A. P. and Stow, J. L., Cytokine secretion is distinct from secretion of cytotoxic granules in NK cells. *J Immunol* 2010. **184**: 4852-4862.
- Wilk, E., Kalippke, K., Buyny, S., Schmidt, R. E. and Jacobs, R., New aspects of NK cell subset identification and inference of NK cells' regulatory capacity by assessing functional and genomic profiles. *Immunobiology* 2008. **213**: 271-283.

Figure legends

Figure 1. Modulation of NCR3 transcript isoforms by SNPs in 43 healthy donors. A, rs986475 (33 T/T; 10 T/C) influences NCR3 T3 transcript levels: subjects carrying the minor allele of this SNP express at least 2 times more T3 NCR3 transcripts. B, rs11575836 (35 T/T, 8 T/C or C/C) modulates NCR3 T1 transcript levels. Statistically different groups were identified with a nonparametric Mann-Whitney test.

Figure 2. NKp30 membrane expression on *ex vivo* peripheral blood NK cells quantified by MFI (Mean Fluorescence Intensity) predicts their early activation status assessed with CD69 labeling following stimulation with (A) rhIL-2 and pre-coated anti-NKp30 antibodies or (B) rhIL-2 alone. Correlations were tested with nonparametric Spearman test. (C) Upregulation of NKp30 membrane expression upon exposure to rhIL-2 compared to *ex vivo* expression or control culture (medium only). A monoclonal Ig of the same isotype (IgG2a) as the anti-NKp30 antibody was systematically added to control cultures. Comparisons were done with Mann-Whitney paired tests.

Figure 3. Cytokine secretion is tightly correlated to cytotoxic activity assessed by CD107a immunolabelling (percentage of positive NK cells). IFN γ (A), GM-CSF (B) and TNF α (C) concentrations were evaluated by CBA in the supernatants further to stimulation with anti-NKp30 antibodies and rhIL-2. Correlations were tested with nonparametric Spearman test.

Figure 4. Pairwise correlation between amounts of cytokines secreted after NK stimulation with (A) rhIL-2 alone or (B) rhIL-2 and anti-NKp30 antibodies. Correlations were tested with nonparametric Spearman test.

Figure 5. Correlation of NKp30 expression with cytotoxic response but not with cytokine secretion. Enriched NK cells were stimulated overnight with anti-NKp30 antibodies and rhIL-2 before measuring the cytotoxic response by CD107a immunolabeling and cytokine secretion by CBA. These parameters were confronted to membrane expression (MFI) of NKp30 assessed in (A) NK cells prior to stimulation or (B) NK cells activated with rhIL-2 alone. Correlations were tested with the nonparametric Spearman test.

Figure 6. NKp30 expression is significantly correlated with (A) NKp46 but not with (B) NKG2D expression at the surface of freshly enriched NK cells. NKp46 (C) but not NKG2D (D) expression correlates with CD107a externalization after NKp30 cross-linking. Expression levels are given in MFI. Correlations were tested with the nonparametric Spearman test.

Table 1. Effect of NKp46 and NCR3/NKp30 expression or NCR3 SNPs on NK cell cytotoxic function.

Expression of the functional cytotoxicity marker CD107a induced by NKp30 triggering in the presence of rhIL-2 was fitted using linear models including NKp46 and NKp30 membrane expression levels, NCR3 isoform transcripts or NCR3 SNPs. These models were then compared to the simple model with NKp46 alone, taken as reference.

Model terms added to NKp46	Explained Variance (%)	Overall p	Comparison with reference (p)
-	44	0.00033	-
NKp30	44	0.00124	NS
T1	51	0.00029	0.057
T2	53	0.00021	0.040
T3	44	0.00126	NS
T1+T2	53	0.00019	0.036
rs11575836*C	52	0.00024	0.047
rs986475*C	45	0.00098	NS

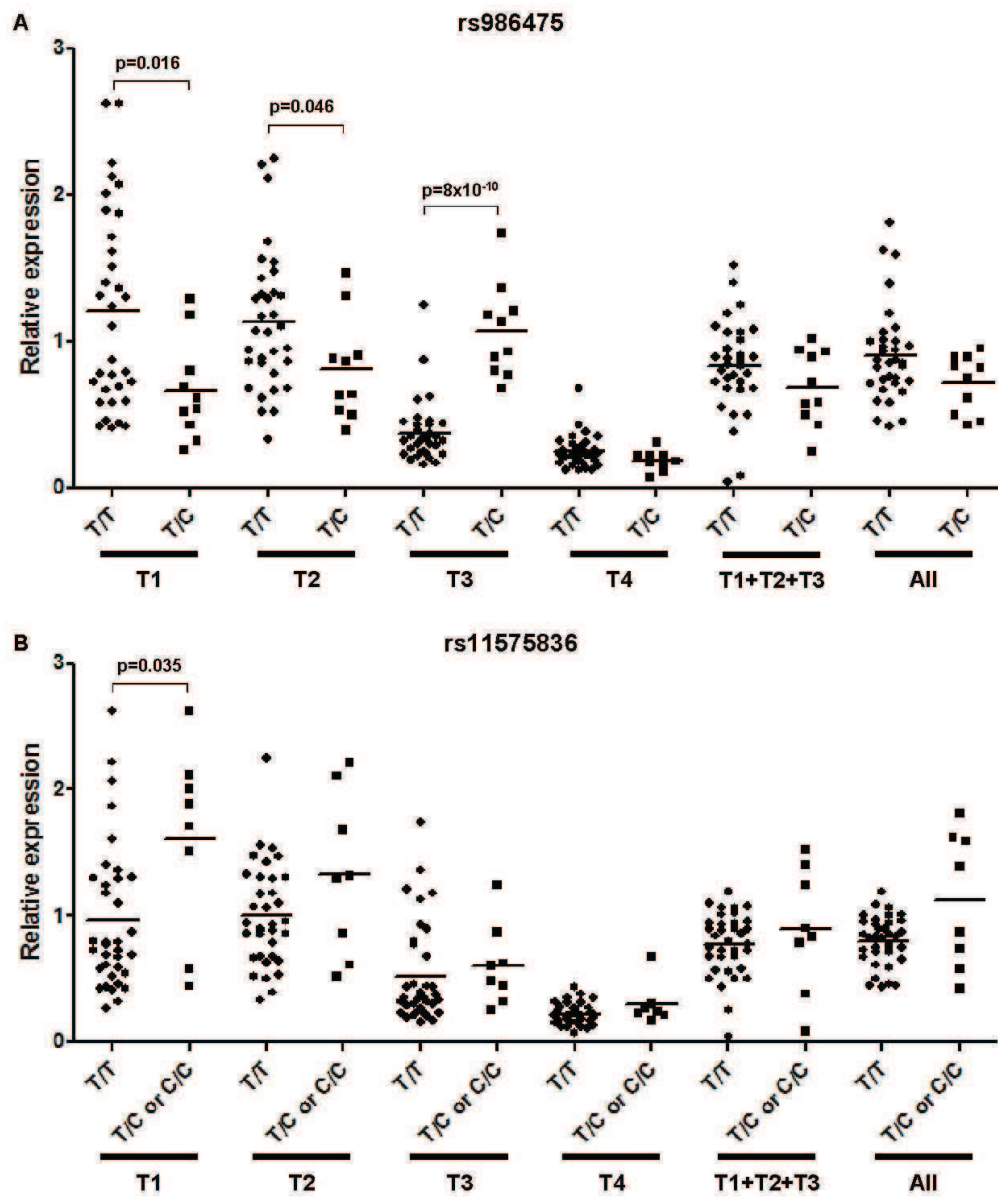


Figure 1.

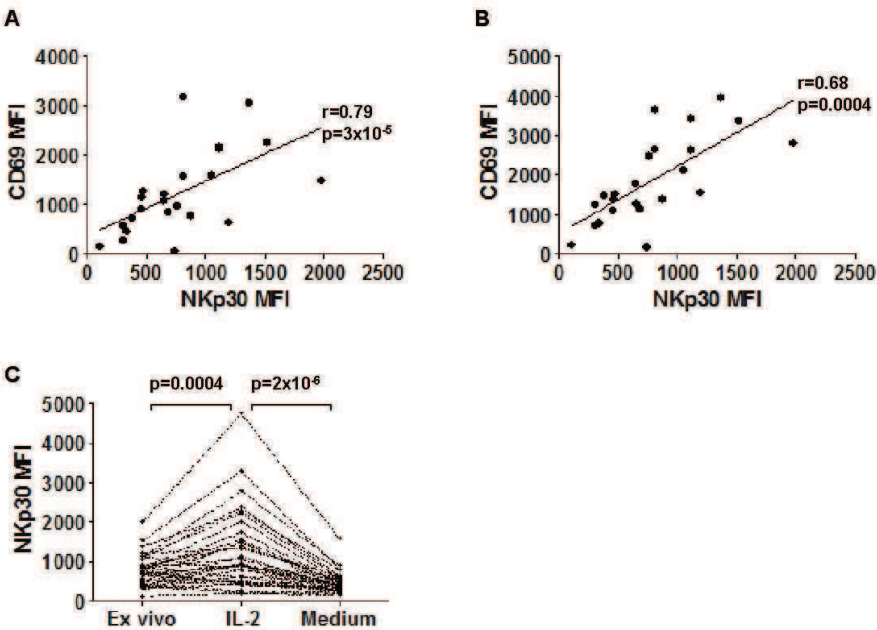


Figure 2.

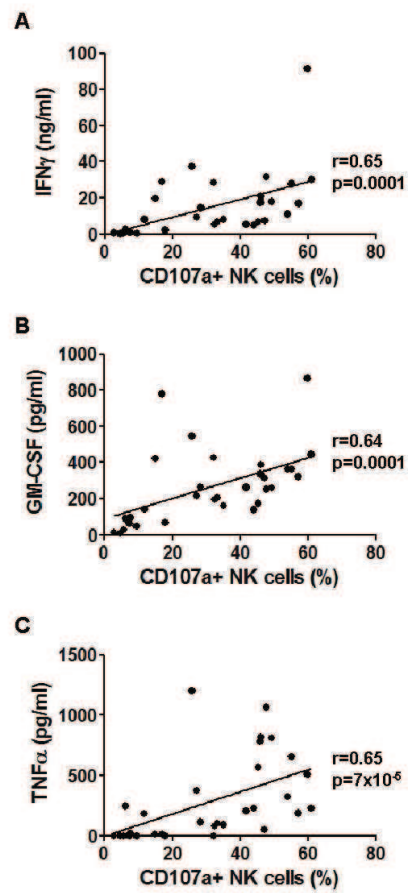


Figure 3.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

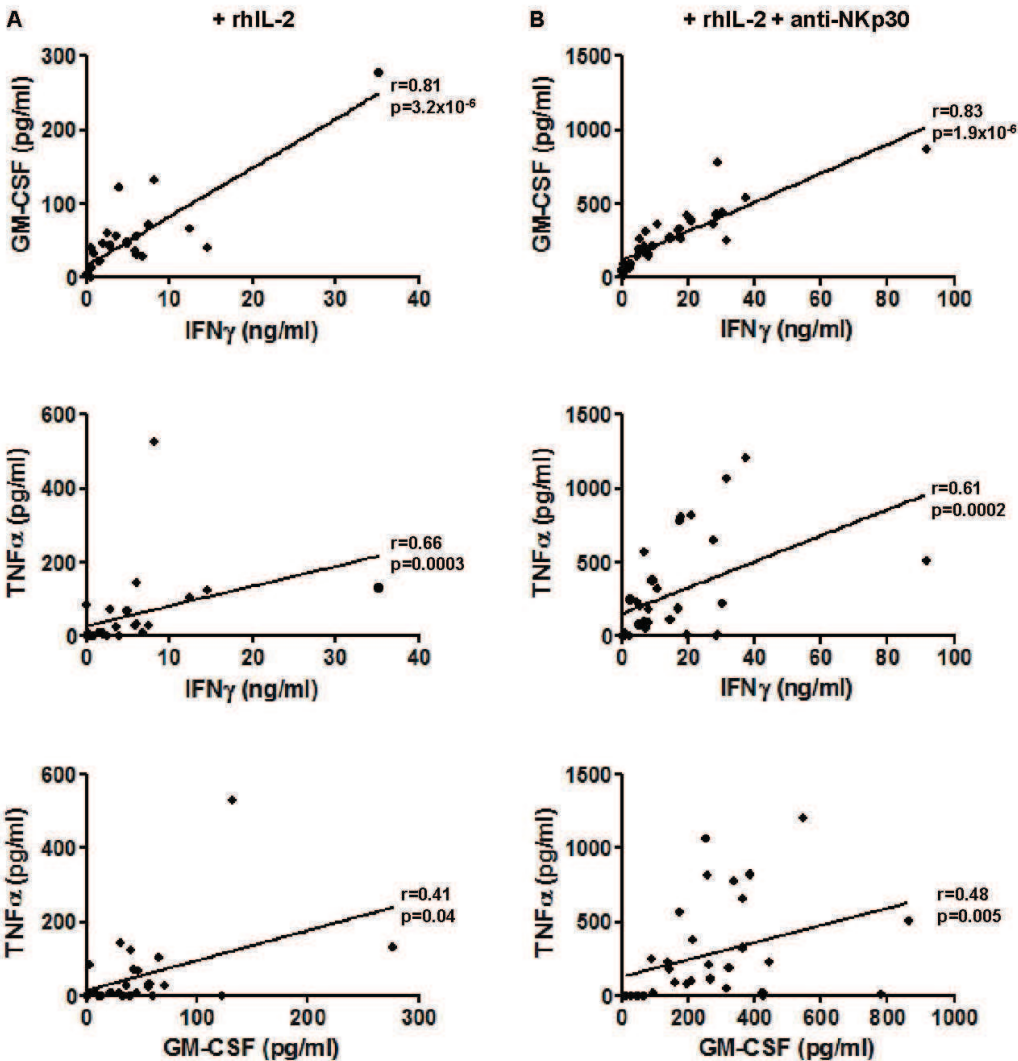


Figure 4.

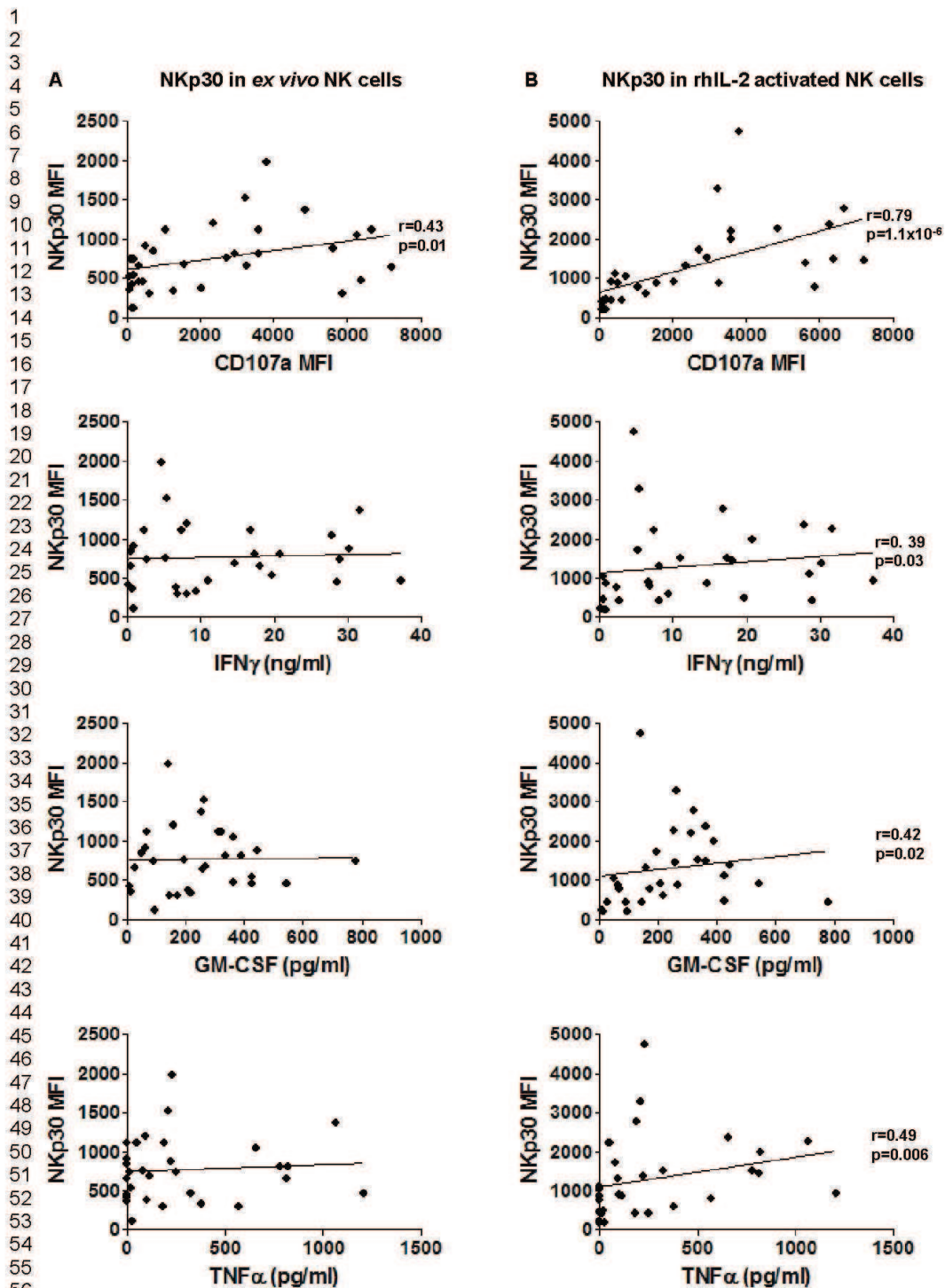


Figure 5.
Wiley - VCH

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

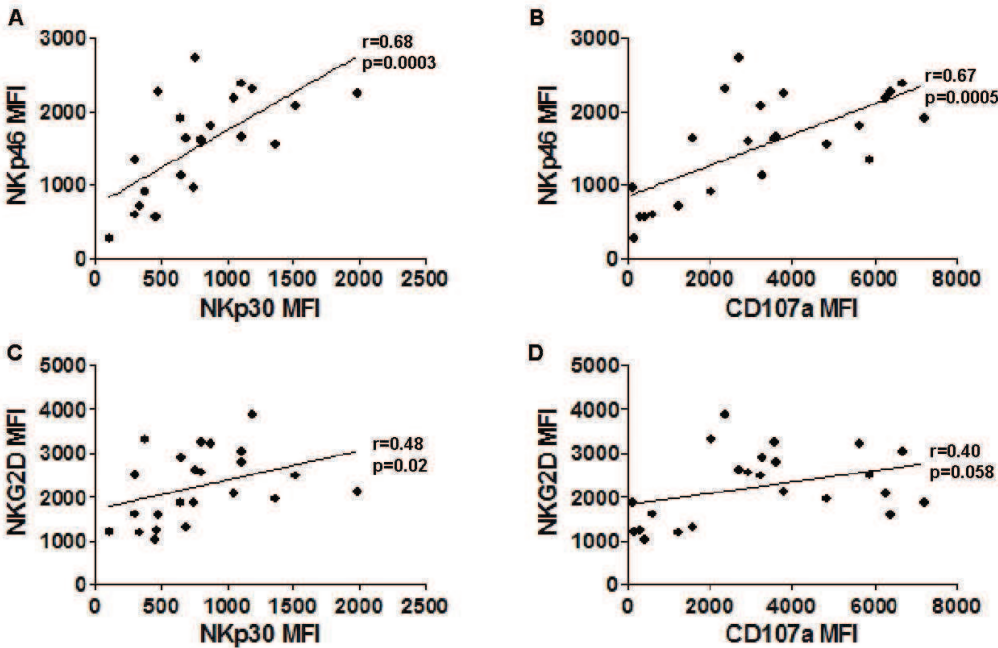
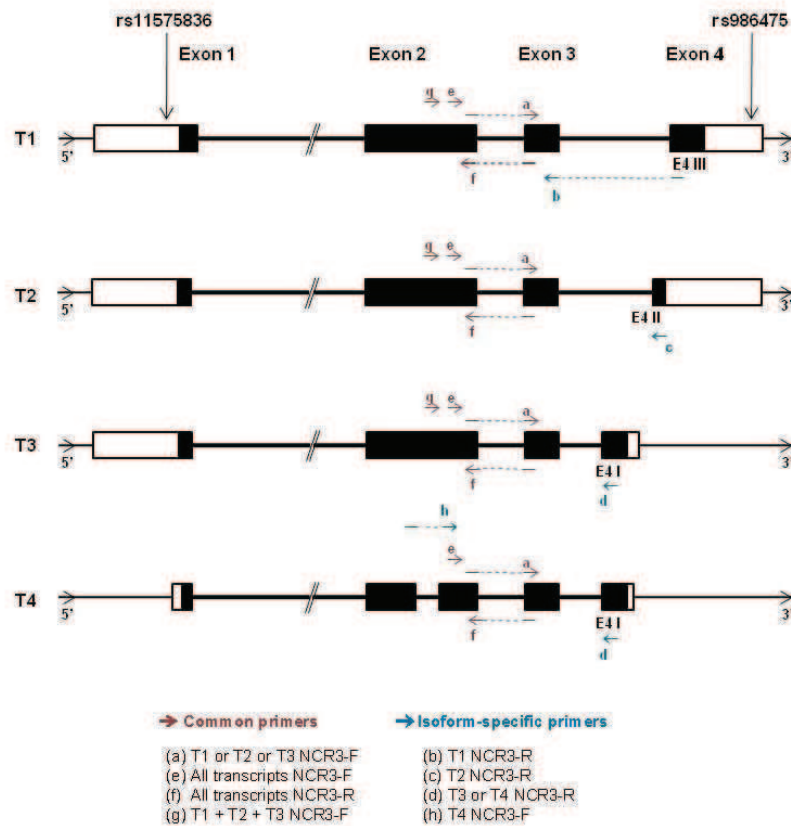
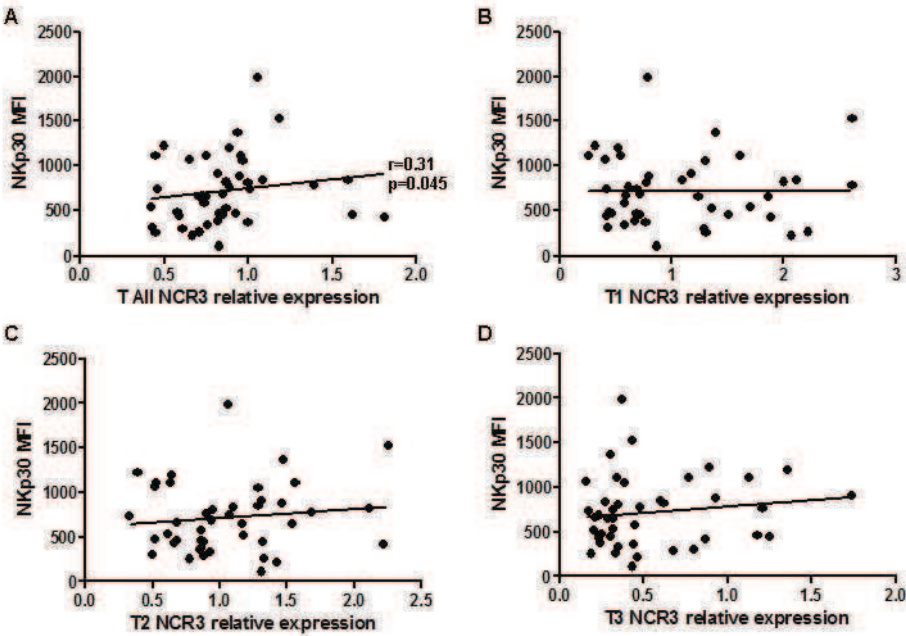


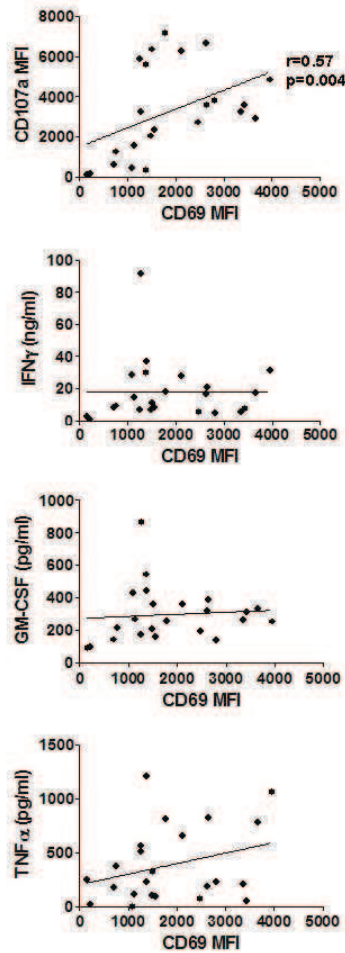
Figure 6.



Supplementary figure 1. Graphic representation of NCR3 gene transcribed regions based on Vertebrate Gene Annotation (VEGA, <http://vega.sanger.ac.uk>). These are shown as boxes where coding segments are filled and untranslated regions are open. Note that the NCR3 gene is actually encoded on the negative strand but is here displayed “classically”, with the 5’ end on the left side and the 3’ end on the right side. Primer pairs were designed to discriminate the four known protein-encoding NCR3 transcripts. Primer (a) was paired with (b), (c) or (d) to quantify T1, T2 or T3+T4 isoforms, while the (h)(d) pair was used specifically for T4. The (e)(f) pair was used to amplify all four transcripts and the (g)(f) pair was taken to amplify the T1, T2 and T3 but not T4 transcripts. T4 was expressed at low levels above background (not shown) and varied little among donors (see Figure 1).

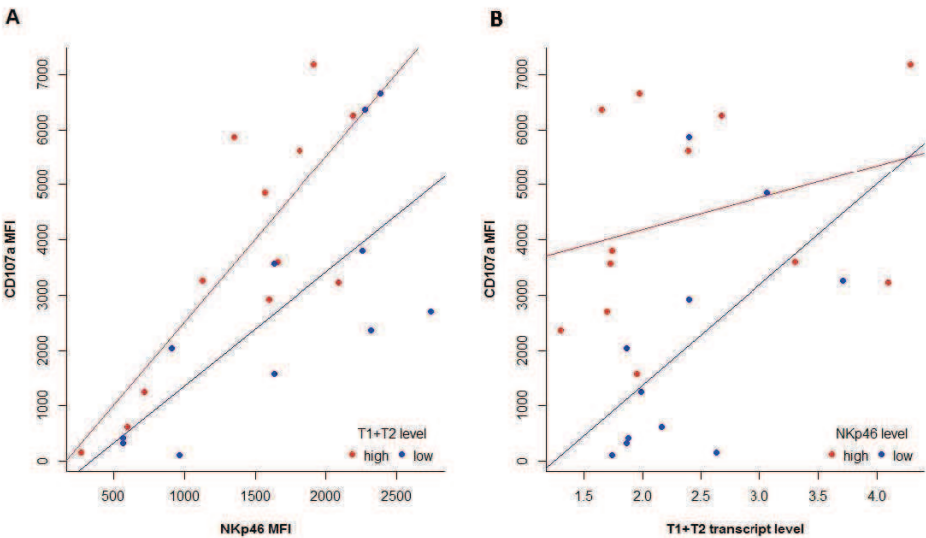


Supplementary figure 2. Correlation of the mean fluorescence intensity (MFI) of NKp30 membrane expression with the overall level of NCR3 transcript (A) but not with T1 (B), T2 (C) or T3 (D) isoforms. Correlations were tested with nonparametric Spearman test.

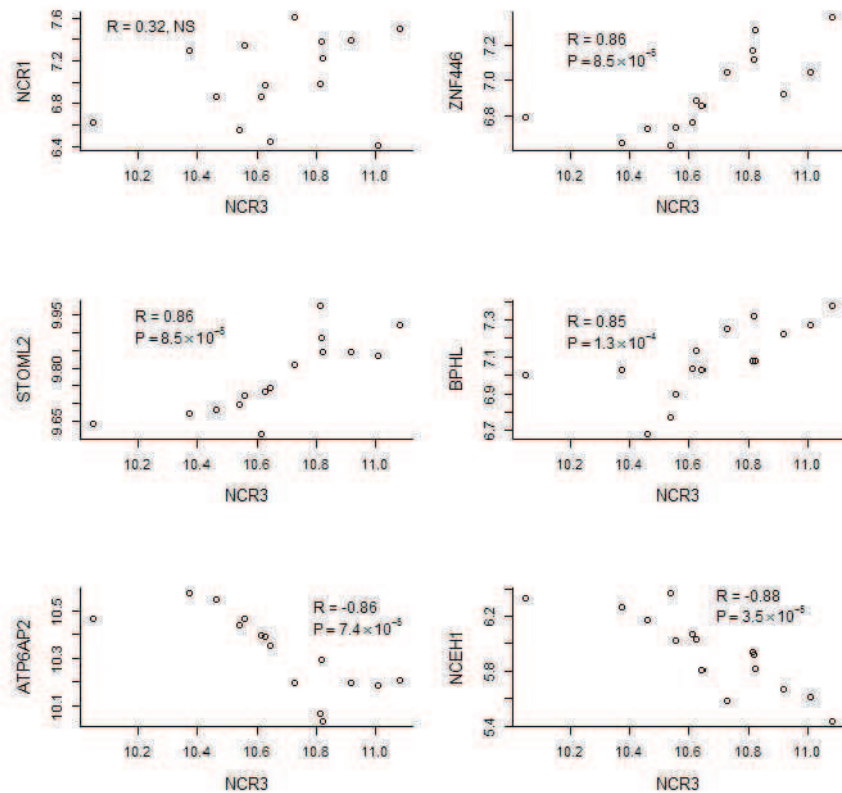


Supplementary figure 3. Membrane expression of CD69 (MFI) correlates with the cytotoxic NK cell response (CD107a, MFI) but not with the cytokine production following overnight NKp30 stimulation in the presence of rhIL-2. Correlations were tested with nonparametric Spearman test.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Supplementary figure 4. Combined influence of NKp46 expression and T1/T2 NCR3 message levels on CD107a immunolabeling. (A) Correlations between NKp46 and CD107a expression in subjects with high (greater than median, red symbols) or low (less than median, blue symbols) levels of T1 plus T2 NCR3 transcripts. For a given expression of NKp46, subjects with higher values of T1 and T2 transcripts express greater levels of CD107a. (B) Correlations between T1 and T2 NCR3 transcript levels with CD107a labeling in subjects with high (greater than median, red symbols) or low (less than median, blue symbols) membrane expression of NKp46. Subjects with higher expression of NKp46 tend to express higher level of CD107a. This effect seems to weaken at high values of T1 plus T2 NCR3 transcripts.



Supplementary figure 5. Plots of public microarray data (log2 fluorescence intensities) showing (A) lack of correlation of NCR1 with NCR3 transcript levels and (B-F) the 5 top genes best correlated with NCR3. Normalized data (GEO reference: GSE26163) were analyzed under the R environment. These consisted of 48803 probes measurements in NK cells from 15 healthy subjects. Twelve of these subjects were sampled two or three times over a one-month period. Probes with within-subject coefficient of variation (CV) greater than 5% in one or more of these 12 subjects were filtered out. This left 7370 probes with stable expression, notably including NCR3, for further analysis. Correlation of NCR3 probe fluorescence intensity with levels of other stable probe was tested with the nonparametric Spearman method. Exact P for the Spearman statistic in this small sample ($n=15$) was computed with the `pspearman` R library. ZNF446: zinc finger protein 446, STOML2: stomatin (EPB72)-like 2, BPHL: biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase), ATP6AP2: ATPase, H⁺-transporting lysosomal accessory protein 2, NCEH1: neutral cholesterol ester hydrolase 1.

Article 2

Sequence analysis of the Natural Cytotoxicity Receptor 3 (NCR3) locus in patients with early-onset myasthenia gravis (MG) reveals two rare disease-associated missense variants and supports a role for NK cells in MG pathogenesis.

Jean-Grégory Cormier, **Nathalie Germaud**, Bruno Eymard, Tarek Sharshar, Henri-Jean Garchon.

(En préparation – Objectif soumission à Neurology)

L'analyse du locus du récepteur à cytotoxicité naturelle 3 (NCR3) chez des patients atteints de myasthénie auto-immune (MG) à développement précoce révèle deux variants rares « faux-sens » associés à la pathologie et soutien un rôle des cellules NK dans la pathogénèse de la MG - Avant-propos

Objectif :

La myasthénie auto-immune (MG) est une pathologie rare de la jonction neuro-musculaire caractérisée par une faiblesse des muscles striés. Chez la majorité des patients, on retrouve des auto-anticorps dirigés contre le récepteur musculaire de l'acétylcholine (RACH) bloquant la transmission du message nerveux au muscle. L'étiologie du processus auto-immun reste mal comprise et certainement hétérogène. Il existe en effet plusieurs formes cliniques de MG. La plus fréquente se présente avec une hyperplasie folliculaire du thymus (TFH), touche principalement les femmes jeunes et a été associée avec l'haplotype 8.1 du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les allèles de cet haplotype sont en fort déséquilibre de liaison ce qui rend la région particulièrement complexe à analyser. Un intervalle plus restreint, couvrant 1Mb de la région du CMH, a cependant été identifié comme contenant le locus de susceptibilité à la maladie. Il regroupe 43 gènes situés dans la région de classe I proximale et celle de classe III du CMH.

Parmi ces gènes, nous avons choisi NCR3 comme candidat. Sa position physique, entre deux marqueurs parmi les plus fortement associés, sa fonction dans l'activation des cellules NK et le rôle de ces cellules de plus en plus souvent invoqué dans la genèse de l'autoimmunité justifient l'analyse détaillée de son polymorphisme. Par ailleurs, les cellules NK ont été impliquées dans le développement de la myasthénie auto-immune expérimentale.

Démarche expérimentale :

Nous avons étudié les ADN de 133 patients MG avec TFH et de 100 individus contrôles. Nous avons re-séquéncé les 4 exons du gène NCR3 et ses régions flanquantes, par la méthode de Sanger, sur une longueur totale de 2856 nucléotides. Nous avons par ailleurs identifié les individus porteurs de l'haplotype 8.1 au moyen de trois marqueurs microsatellites dont certains allèles sont associés spécifiquement à cet haplotype (TNFd, C12C et C125).

Résultats :

Le séquençage du gène NCR3 n'a révélé aucune différence dans la fréquence des SNPs communs entre les patients et les individus contrôles. Par contre nous avons mis en évidence deux nouveaux variants rares retrouvés exclusivement chez les patients myasthéniques. La variation L19R retrouvée chez deux patients et qui induit une modification du codon 19 remplaçant la leucine par une arginine dans la séquence polypeptidique est particulièrement intéressante. Ce changement, situé dans une région

conservée du gène est prédite comme délétère sur la structure de la protéine par deux algorithmes différents (SIFT et POLYPHEN-2). Ce variant a d'autant plus d'intérêt qu'il n'a pas été observé dans les 1092 individus génotypés dans le projet « 1000 Génomes ». Nous pouvons supposer que l'acide aminé ainsi modifié, comportant une chaîne latérale chargée positivement (Arg) au lieu d'être hydrophobe (Leu), et qui se trouve en seconde position sur la séquence primaire de la protéine mature, pourrait induire des modifications de sa structure et donc de sa fonction.

Sequence analysis of the Natural Cytotoxicity Receptor 3 (NCR3) locus in patients with early-onset myasthenia gravis (MG) reveals two rare disease-associated missense variants and supports a role for NK cells in MG pathogenesis.

Jean-Grégory Cormier¹, Nathalie Germaud¹, Bruno Eymard², Tarek Sharshar³, Henri-Jean Garchon¹

¹ Institut Cochin, CNRS UMR 8104; Inserm U1016; Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France ; University of Versailles Saint-Quentin, France

² Hôpital de la Salpêtrière, University Pierre et Marie Curie, Paris

³ Hôpital Raymond Poincaré, University of Versailles Saint-Quentin, Garches

Corresponding author : HJG <henri-jean.garchon@inserm.fr>

Contributions: JGC and NG did the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript; TS and BR recruited the patients and revised the manuscript; HJG designed the study, analyzed the data and wrote the manuscript.

Conflicts of interest: none

Acquired generalized myasthenia gravis (MG) is a rare autoimmune disease of the neuromuscular junction, resulting in postsynaptic blockade of nerve transmission ¹. Although its etiology is not fully understood, there is strong evidence for a role of genetic factors. Indeed, the subset of patients who are predominantly women with an early onset age (EOMG) and thymus follicular hyperplasia (TFH), shows a well-established and strong association with the 8.1 haplotype of the major histocompatibility complex (MHC). This recurrent haplotype in Caucasians stably displays conserved alleles over 3 Mb, notably including HLA-A1, HLA-B8 and HLA-DR3. However, because of long-range linkage disequilibrium, the fine mapping of the causative locus has remained a major challenge. Based on informative microsatellites ² and then SNP-microarray data (not published) the disease-containing interval is currently thought to extend over 1 Mb in the proximal class I and class III regions and to include 43 genes.

To gain further insight, we undertook a detailed characterization of the sequence polymorphism of the NCR3 candidate locus that maps between two microsatellites, TNFd and D6S2788, showing the strongest associations. Besides, its function is consistent with a role in MG pathogenesis as it encodes a membrane activating receptor (NKp30) of the immunoglobulin superfamily predominantly expressed on Natural Killer (NK) cells ³. There is growing evidence for a critical role of NK cells in autoimmunity ⁴ and specifically in experimental autoimmune myasthenia gravis ⁵. Subsets of NK cells also appear to be altered in untreated MG patients ⁶.

We investigated 133 French EOMG patients (115 women and 18 men) with young onset age (median, 25; interquartile range, 20-33), positive for serum anti-acetylcholine receptor autoantibodies and with TFH reported after thymectomy. We used a control group of 100 population-matched persons. We re-sequenced the 4 exons of NCR3 and their flanking sequences (Sanger method), covering 2856 nucleotides. Altogether, we detected 20 variants. Thirteen of these were transcribed; eight were coding; four were non-synonymous. No difference in allele and genotype frequencies of common variants was observed between patients and controls (not shown). In particular, there was no variant that could have accounted for the major effect of the 8.1 haplotype in MG, including after conditioning the analysis on this haplotype. Our sample provided us with full power to detect it.

In contrast, examination of rare variants pointed to two new coding polymorphisms found only in patients, at positions 31,556,873 (His193Tyr, CAT>TAT) and 31,557,891 (Leu19Arg, CTC>CGC) of chromosome 6. Since NCR3 is encoded on the lower strand, we first discuss the Leu19Arg variation which was detected in two unrelated patients, a woman and a man with onset age of 27 and 20, respectively. Importantly, this variant is not reported in the 1092 subjects of the Phase I “1000 Genomes” project. However, it has now been recorded (rs142675986) in 0.47% (20/4217) of the

subjects with heart, lung and blood disorders enrolled in the Exome Sequencing Program (<https://esp.gs.washington.edu/drupal/>), suggesting that it might have a much broader impact on health than just MG.

This non-conservative change is predicted to be deleterious by the SIFT algorithm (<http://sift.jvci.org>) and “probably damaging” by Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) with a score of 0.998 (scale from 0 to 1, 1 being most deleterious), notably because this is a highly conserved position with also conserved surrounding residues in mammalian species. The Leu19 is the first residue of the mature protein and therefore its substitution might impair the cleavage of the signal peptide, just after Ala18. However, this is not predicted to be the case by the SignalP algorithm (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Examination of the crystal structure, in contrast, shows that the highly hydrophobic lateral chain of the Leu is buried between both beta-sheets forming the NKp30 immunoglobulin-like domain ⁷ (Figure 1). The charged lateral chain of an Arg presumably would tend to interact with the solvent and decrease the stability of both beta-sheets.

The other variant (His193Tyr), at chr6:31,556,873, is located in the cytoplasmic tail of NKp30. This position is less conserved among mammals and the substitution is predicted to be tolerated (SIFT) or benign (Polyphen-2). However, it has not been reported elsewhere and the presence of the Tyr residue creates a potential phosphorylation site (TyrLeuLeuPro) for src kinases. The addition of a phosphate group might increase the hydrophilicity of the cytoplasmic tail, alter its interaction with the CD3 ζ adaptor and subsequently affect signal transduction.

Our findings further support a role of NK cells in the regulatory defect conducive to autoimmunity at least in some MG patients and warrant a detailed investigation of their function in these patients.

References

1. Vincent A. Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nat Rev Immunol* 2002;2:797-804.
2. Vandiedonck C, Beaurain G, Giraud M, et al. Pleiotropic effects of the 8.1 HLA haplotype in patients with autoimmune myasthenia gravis and thymus hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:15464-15469.
3. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001;19:197-223.
4. Schleinitz N, Vely F, Harle JR, Vivier E. Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 2010;131:451-458.
5. Shi FD, Wang HB, Li H, et al. Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nat Immunol* 2000;1:245-251.
6. Suzuki Y, Onodera H, Tago H, et al. Altered populations of natural killer cell and natural killer T cell subclasses in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2005;167:186-189.
7. Li Y, Wang Q, Mariuzza RA. Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6. *J Exp Med* 2011;208:703-714.

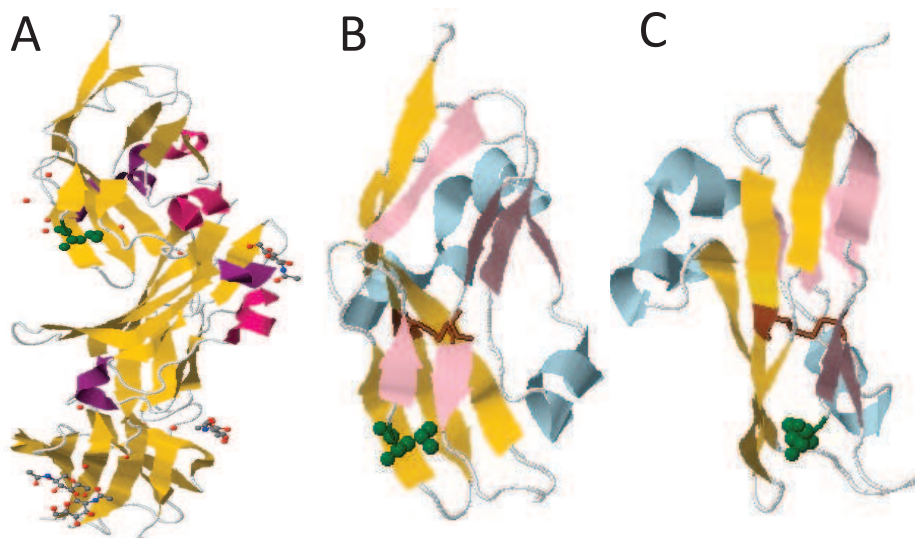


Figure 1. NKp30 structure and Leucine 19, highlighted in green. (A) NKp30 is shown bound to its B7-H6 ligand, on top of it. The 3PV6 protein data bank structure file has been displayed using Jmol with default parameters. (B) The NKp30 chain is magnified and shown alone. The A, B, E and D strands of the forefront β -sheet are colored in pink, and the α -helices in blue. The two cysteines 39 and 108 forming the conserved disulfide bond holding the β -sheets are colored in brown. (C) View of (B) after a rotation of 70° around the y axis.

Résultats complémentaires à l'article 2 :

Détails sur le criblage du polymorphisme du gène NCR3

Introduction :

La myasthénie auto-immune acquise généralisée est médiée par des auto-anticorps principalement dirigés contre le récepteur musculaire de l'acétylcholine (RACH). Au-delà de leur rôle bien déterminé dans l'immunité anti-tumorale et anti-virale, les données récentes de la littérature suggèrent un rôle des cellules NK dans les maladies auto-immunes (PR, la SEP, le DT1). Les cellules NK pourraient, en outre, jouer un rôle clé dans l'initiation et/ou le développement dans le thymus de la réaction auto-immune dans la myasthénie, de par leur interaction avec les DC (366, 367) et les LB (368), lesquels sont particulièrement impliqués dans la myasthénie. Par ailleurs, il a été démontré que le granzyme B, produit par les cellules NK et les CTL, peut cliver les sous-unités du RACH, soulignant ainsi l'implication de cette enzyme et probablement des cellules NK dans l'initiation de la myasthénie auto-immune (246).

Divers facteurs génétiques ont été associés à la pathologie (369).

Une association significative de deux marqueurs microsatellites TNFd ($p=6,4 \times 10^{-7}$) et D6S2788 ($p=0,00084$), situés respectivement en aval (environ 420 pb) et en amont (environ 340 pb) du gène NCR3 a ultérieurement été mise en évidence dans le laboratoire avec la forme de la myasthénie avec hyperplasie folliculaire thymique (MG avec TFH) ainsi qu'avec le titre sérique des auto-anticorps ($p=0,00054$ pour le TNFd, et $p=0,0127$ pour le D6S2788) dirigés contre le RACH. Nous nous sommes donc intéressés à NCR3 comme facteur impliqué dans la pathogénèse de la MG avec TFH.

Plan expérimental :

Ce travail a été réalisé à partir d'un échantillon composé de 133 patients myasthéniques indépendants présentant une hyperplasie thymique et de 100 sujets sains, tous d'origine caucasienne française.

Caractérisation du polymorphisme du gène NCR3

Les régions codantes, les jonctions intron-exon et les régions flanquantes en 5' et 3' du gène NCR3 ainsi qu'une partie du premier intron potentiellement régulateur ont été amplifiées par PCR puis séquencées sur les deux brins à l'aide d'un séquenceur ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Les six paires d'amorces utilisées pour les réactions de PCR et/ou de séquençage ont été définies avec le logiciel PRIMER3 (Table S1). L'amplification par PCR a été réalisée avec la Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen) en trois étapes sous thermocycleur, avec une dénaturation initiale pendant 3 min. à 94°C, suivie de 42 cycles de PCR comportant une phase de dénaturation pendant 30 sec. à 94°C, puis une étape d'hybridation des amorces, pendant 30 sec à 55°C (à l'exception du primer pour NCR3_A1 dont la température d'« annealing » se situe à 58°C) et enfin une phase d'extension à 72°C,

30 sec, pour les petits fragments (NCR3_Pro and NCR3_Int) ou 1 min pour les fragments plus longs (NCR3_A1, NCR3_A2, NCR3_A3 and NCR3_A4). Pour finir, une étape d'extension finale, 10 min à 72°C, est réalisée. Avant la réaction de séquençage à proprement parler (effectuée de façon standardisée à la plateforme de séquençage de l'Institut Cochin), les produits de PCR sont purifiés sur plaque Millipore à filtres et quantifiés avec le Nanodrop. La lecture des séquences, la réalisation des contigs, et la détection des polymorphismes à partir des chromatogrammes ainsi obtenus, ont été réalisées à l'aide du logiciel Seqscape (Applied Biosystems).

Validation des mutations codantes rares chez les patients myasthéniques

Afin de distinguer les loci spécifiques des nouvelles mutations codantes d'erreurs d'incorporation de la Taq polymérase, nous avons réalisé le re-séquençage des zones du gène NCR3 où se trouvent les variants, C2-118 (L19R) and C2-1136 (H193Y), sur des fragments de PCR indépendantes tandis que la validation du SNP rs34816476 (L140F) a été effectuée sur la base du test du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), avec l'enzyme de restriction Mbo II.

Résultats :

Le gène NCR3, couvrant 4103 pb (position génomique : 31556660-31560762 selon la base de données UCSC, build hg19), est composé de 4 exons codants et présente des variants d'épissage plus particulièrement dans la région 3' du gène (Fig. 1).

Au total, nous avons séquencé 2391 pb (2856 pb chevauchantes), chez chaque individu, correspondant aux régions codantes du gène NCR3, aux jonctions intron-exon, ainsi qu'aux régions potentiellement régulatrices à savoir le début du premier intron (environ 230 pb) ainsi que 350 pb en amont du 5' UTR exon du gène. De cette façon, nous avons pu identifier 23 polymorphismes (Table 1) dont 20 dans le gène NCR3 et trois dans la région 3' non traduite (3' UTR) du gène LST1 (immédiatement voisin du côté télomérique), soit une densité moyenne d'environ un SNP toutes les 100 pb. Les 8 polymorphismes codants détectés incluent cinq variants conduisant à un changement d'acide aminé dans la séquence protéique tandis que trois sont synonymes. De plus, nous avons pu observer dans notre échantillon, quatre polymorphismes introniques, cinq SNPs situés dans les régions 5' et 3' non traduite du gène NCR3 et enfin, trois variants localisés en amont du gène. Parmi ces variants, cinq n'étaient initialement pas répertoriés dans les bases de données publiques.

Notamment, parmi les trois variants codants présents uniquement chez les patients, L19R, L140F et H193Y, seul H193Y demeure à ce jour non encore décrit. En effet, le variant L140F (rs34816476) a été décrit chez des sujets sains tandis que L19R (Rs1423675986) a été identifié dans une cohorte de sujets atteints de pathologies cardiovasculaires et pulmonaires (Exon sequencing program du NHBLI) mais reste non décrit à ce séjour chez des sujets sains, notamment chez les 1092 personnes séquencées dans le cadre du programme 1000 Genomes.

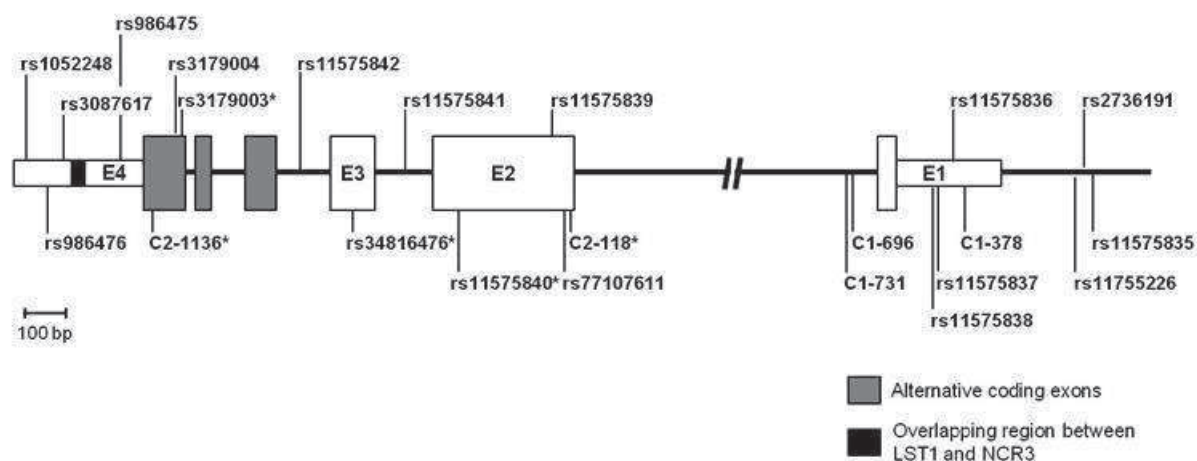


Figure 1. Common and rare (MAF < 2%) polymorphism locations detected in the NCR3 and LST1 loci by sequencing.

Boxes marked the exons (E) of the NCR3 gene, thinner boxes indicating the untranslated (UTR) regions and lines represent introns and the upstream region. Grey and black boxes represent the alternative coding exons and the overlap between NCR3 and LST1, respectively. Common polymorphisms are placed at the top of the scheme and rare ones at the bottom.

*Non-synonymous coding SNPs.

Table 1. Description of the 23 variants identified by screening the NCR3 polymorphisms.

SNPs	Genomic Position ^a	Locus	Location	Alleles ^b	Number (%)	
					Patients (n=133)	Controls (n=100)
rs1052248	3 1556581	<i>LST1</i>	3' UTR exon	T/A	77 (29.4)	61 (33.9)
rs986476	3 1556635	<i>LST1</i>	3' UTR exon	A/T	1 (0.4)	2 (1.0)
rs3087617	3 1556656	<i>LST1</i>	3' UTR exon	A/T	23 (8.6)	28 (14.9)
rs986475	3 1556709	<i>NCR3</i>	3' UTR exon	C/T	17 (6.4)	15 (7.5)
C2-1136	3 1556873	<i>NCR3</i>	Exon 4 (H193Y)	T/C	1 (0.4)	NO
rs3179004	3 1556922	<i>NCR3</i>	Exon 4 (syn.)	A/G	12 (4.5)	7 (3.5)
rs3179003	3 1556928	<i>NCR3</i>	Exon 4 (R174S)	T/G	10 (3.8)	6 (3.0)
rs11575842	3 1557226	<i>NCR3</i>	Intron 3	T/C	32 (12.0)	27 (13.6)
rs34816476	3 1557381	<i>NCR3</i>	Exon 3 (L140F)	T/C	2 (0.8)	NO
rs11575841	3 1557491	<i>NCR3</i>	Intron 2	A/G	5 (1.9)	4 (2.1)
rs11575840	3 1557640	<i>NCR3</i>	Exon 2 (A103T)	A/G	4 (1.6)	3 (1.6)
rs11575839	3 1557791	<i>NCR3</i>	Exon 2 (syn.)	T/C	8 (3.2)	5 (2.8)
rs77107611	3 1557836	<i>NCR3</i>	Exon 2 (syn.)	A/G	5 (2.0)	1 (0.5)
C2-118	3 1557891	<i>NCR3</i>	Exon 2 (L19R)	G/T	2 (0.8)	NO
C1-731	3 1560379	<i>NCR3</i>	Intron 1	C/T	1 (0.4)	NO
C1-696	3 1560414	<i>NCR3</i>	Intron 1	A/G	NO	1 (0.5)
rs11575838	3 1560565	<i>NCR3</i>	5' UTR exon	A/G	5 (2.0)	1 (0.5)
rs11575837	3 1560670	<i>NCR3</i>	5' UTR exon	A/G	5 (2.1)	3 (1.5)
rs11575836	3 1560702	<i>NCR3</i>	5' UTR exon	C/T	28 (11.7)	22 (11.2)
C1-378	3 1560732	<i>NCR3</i>	5' UTR exon	A/C	1 (0.4)	NO
rs11755226	3 1560803	<i>NCR3</i>	Upstream	C/A	1 (0.4)	NO
rs2736191	3 1560910	<i>NCR3</i>	Upstream	C/G	10 (4.2)	6 (3.1)
rs11575835	3 1560948	<i>NCR3</i>	Upstream	A/G	4 (1.6)	2 (1.1)

Table S1. Locations and sequences of the primers used for the amplification and the sequencing of the NCR3 locus.

	PCR product	Amplified Genomic region ^a (size in bp)	Primers sequences ^b
CONTIG1	Pro	31560923-31561109 (187)	TTGGCCAGAA GC TAA CCTA
			CACACAA GGTGATT GCTAT GC
	A1	31560341-31560976 (636)	GGTC TGGGTAC TGGT GA GC
			AGAGCCGT GTGT TTCA GCC
			CTCAGGGAGGCAAGCATTTG
	Int	31560225-31560401 (177)	CACACGGGACT CACACAT CAC
TCATAGATT TACT TGGATCTCTCAA			
CONTIG2	A2	31557399-31558008 (610)	CAGGAGGCTGGA CTAGAT GC
			AC CCTATGCC TGGAGAAAGC
			GCTGAGGA TGT TCTGCATGG
	A3	31556925-31557569 (645)	GAATGGAACCCAGAGT TC
			CTCAGCCTGGTGGTCAT GGAG
			GGT GGA GAAAGGTGAGAT GC
			CTGCCTTCTTGGACCTT TCC
	A4	31556503-31557103 (601)	GA TGGGAGGGGCAGTAAG
			GGAGCTGCTCAGTGTTGCAG
			CCCA GA TGTCCCTAGT CCT CT
TGGTCCAGCCAGT AAA AACC			
		CACATCTGCTTCCCCCA GTC	
		CAGTTGCCAAGGAGGAGTC	

^aGenomic positions indicated are those from the reference PGF haplotype in the public database UCSC build hg19 (<http://genome.ucsc.edu/>). ^bPrimers sequences in the 5'-3' orientation. Primers in bold were also used for the amplification step.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les cellules Natural Killer sont des lymphocytes de l'immunité innée essentiels à la mise en place d'une réponse immunitaire robuste contre les cellules modifiées (tumorales ou infectées par un virus). De plus, du fait de leurs propriétés immunorégulatrices, ces cellules se sont révélées comme des acteurs potentiels de la réponse auto-immune (tantôt promoteurs, tantôt inhibiteurs).

L'activation des cellules NK repose sur une balance complexe entre les signaux provenant de leurs récepteurs inhibiteurs (KIRs) et activateurs (NKG2D, NCRs). Ces signaux sont contrôlés de façon très fine. Les études sur les mécanismes régulant l'activation des cellules NK ont essentiellement été consacrées aux KIRs inhibiteurs, avec l'hypothèse qu'ils contrôlaient entièrement la réponse NK. Cependant il a été démontré que même en présence de KIRs et donc d'une maturation/éducation « normale » des cellules NK, il était possible que ces cellules soient incapables de s'activer face à leurs cellules cibles dépourvues de CMH de classe I et d'induire la lyse de ces dernières. Cette activation nécessite donc aussi l'intervention des NCRs activateurs. Le rôle de NKG2D a bien été étudié à cet égard. Par contre, il convient à présent de mieux comprendre le fonctionnement des NCRs, qui constituent l'autre grande famille de récepteurs activateurs des cellules NK. Ainsi, les NCRs, dont les 3 membres ont été identifiés à la fin des années 1980, jouent un rôle fondamental dans l'élimination des cellules tumorales ou infectées par un virus. Un intérêt croissant s'est développé autour du membre NKp30/NCR3 dont le ligand B7-H6, exprimé de façon quasi-exclusive à la surface de nombreuses cellules tumorales (lymphomes, mélanomes, carcinomes...et sur la grande lignée-cible traditionnelle des NK : K562), a été récemment identifié (321). Il est à noter que NKp30 permet aussi d'engager une interaction entre les cellules NK et les DC aboutissant à la maturation ou à la lyse de ces dernières. Ceci pointe le doigt sur le rôle des cellules NK comme intermédiaire entre système immunitaire inné et système immunitaire adaptatif.

Durant ma thèse, j'ai tenté d'apporter des éléments nouveaux de deux ordres sur ce récepteur. Tout d'abord, chez un groupe de sujets sains, j'ai examiné la variabilité de la réponse fonctionnelle des cellules NK à la stimulation de NKp30 et recherché des paramètres corrélés avec cette variabilité ; ensuite, dans un groupe de patients atteints de myasthénie autoimmune, j'ai recherché des variants du gène NCR3 associés à la maladie. J'ai également participé à l'initiation d'un projet en collaboration avec l'équipe du Dr Anne Caignard visant à évaluer le rôle des variants NCR3 dans un contexte tumoral où le rôle des cellules NK et de NKp30 est indéniable : le mélanome cutané.

La 1^{ère} partie de mon projet de thèse a donc consisté en l'étude de la variabilité de la réponse NK dans un contexte physiologique par le biais d'un modèle de stimulation de NCR3/NKp30

La variabilité interindividuelle de la fonction NK influence probablement de façon non négligeable la susceptibilité d'un individu vis-à-vis de divers cancers, de maladies infectieuses et de pathologies inflammatoires. Afin de mieux comprendre cette variabilité, il

est essentiel d'approfondir notre compréhension des mécanismes modulant l'expression des gènes déterminant l'activation des cellules NK. Plusieurs études importantes, initialement réalisées sur des lignées cellulaires lymphoblastoïdes, ont démontré que les niveaux de transcrits d'un gène varient entre les individus et cette variation dépend fortement de facteurs héréditaires (360, 361).

Pour de nombreux gènes, il semble que les polymorphismes régulant leur expression soient localisés *en cis* (370). Toutefois, leur effet peut différer d'un tissu ou d'un type cellulaire à l'autre, ou encore des SNPs différents peuvent moduler un même gène dans des tissus différents (364). Pour minimiser la confusion qui peut résulter de l'étude d'une population hétérogène, nous avons travaillé sur une population cellulaire fortement enrichie en cellules NK. Nous avons également étudiés des sujets sains pour éviter toute perturbation exogène (comme une tumeur ou un traitement).

Dans cette analyse de la variabilité interindividuelle, nous avons concentré nos efforts sur l'étude d'un seul gène, NCR3 (à l'opposé des études sur génome entier), et nous avons donc évalué simultanément et sur un même individu les variabilités à différentes étapes de l'expression du gène, reflétés par le niveau des transcrits (y compris les transcrits alternatifs), par celui de la protéine à la surface cellulaire et enfin par les conséquences fonctionnelles de celles-ci.

Est-il possible de lier un SNP de NCR3 et une modulation transcriptionnelle de ce gène à sa fonction ?

Dans notre cohorte de 43 donneurs sains, nous avons retrouvé l'association robuste entre le port de l'allèle mineur du SNP rs986475 (situé en 3' UTR) et l'augmentation de l'expression du transcrit 3 (T3) de NCR3 (aux dépens de T1 et T2), révélée par les travaux de N.Delahaye et al., chez des individus atteints de sarcome gastrointestinal (GIST) (315).

Par ailleurs, nous avons mis en évidence l'effet d'un autre SNP sur la transcription du gène NCR3 : le SNP rs11575836. L'allèle mineur de ce dernier est en effet associé à un taux plus élevé de transcrit T1. Nos résultats suggèrent, de plus, pour la première fois, une corrélation de ce polymorphisme avec la fonction cytotoxique, représentée par l'externalisation de CD107a, après stimulation du récepteur NKp30. La voie liant le SNP rs11575836 à un épissage alternatif préférentiel du T1 n'est pas encore bien claire à nos yeux. Cependant, rs11575836 est en déséquilibre de liaison parfait avec le SNP rs11575842, localisé dans le dernier intron du gène NCR3 où il pourrait altérer un site de fixation pour un facteur d'épissage de l'ARN : ASF2. rs11575842 pourrait donc être le SNP causal influençant le choix du dernier exon du gène NCR3. De nouvelles études fonctionnelles devront être faites pour valider cette hypothèse.

A l'inverse, nous n'avons pas retrouvé l'effet du SNP rs986475 et du transcrit T3 sur la fonction NK (cytotoxicité et production de $\text{TNF}\alpha$) démontré dans la cohorte de patients GIST (315). Nous avons pourtant des conditions de cultures similaires. Ces discordances

pourraient provenir du temps d'incubation: beaucoup plus court dans l'étude de N.Delahaye et al. ou simplement du fait que nous sommes dans deux conditions différentes : des sujets sains d'un côté et des patients sous traitement de l'autre. En effet, l'IL-10, cytokine immunosuppressive dont il a été montré qu'elle était un élément vraisemblablement important de la diminution de cytotoxicité observée chez les patients GIST porteurs de l'allèle mineur du SNP rs986475, est indétectable dans nos conditions de culture. La production de cette cytokine est probablement exacerbée dans le contexte de la tumeur. Il a, par ailleurs, récemment été démontré que le polymorphisme du promoteur du gène même de l'IL-10 influence le niveau des transcrits de l'IL-10 et que l'haplotype associé à une augmentation de l'expression du gène est plus fréquent chez les patients atteints de cancer du poumon (371). La production d'IL-10 semble être liée à une petite fraction de cellules NK qui proliférerait de préférence dans un contexte pathologique comme par exemple une infection au VHC (372, 373). En outre, hors contexte pathologique, selon PT. Mehrotra et al., l'IL-10 produite par les cellules NK de donneurs sains n'est détectable qu'au bout de 48h de culture *in vitro* en présence des deux cytokines IL-2 et IL-12 (110). La diminution de la cytotoxicité et de la production de TNF α observée par N.Delahaye et al. chez les patients GIST pourrait donc être plutôt la conséquence d'un milieu fortement immunosuppresseur dans lequel l'effet fonctionnel du SNP rs986475 pourrait alors se manifester.

Ainsi, il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en étudiant la sécrétion d'IL-10 par les cellules NK de sujets sains après stimulation du récepteur NKp30 *in vitro*, pendant 48h, en présence des cytokines favorisant son expression : l'IL-12 et l'IL-15 et au regard des polymorphismes de NCR3. Le TNF α que nous avons eu aussi plus de difficultés à détecter après stimulation du NKp30 pourrait être mieux appréhendé en adaptant les conditions de culture à sa production (temps d'incubation, ajout de cytokines amplificatrices de sa sécrétion telles que l'IL-12+IL-15).

Décryptage de la relation phénotype NKp30 / Fonction NK

Nous avons par ailleurs démontré pour la première fois une corrélation étroite entre l'expression du récepteur NKp30 à la surface des cellules NK *ex vivo* et la réponse cytotoxique de ces cellules après engagement du récepteur. Ce résultat est d'autant plus remarquable que nous ne retrouvons pas de corrélation équivalente avec la production de cytokines. Cette absence de corrélation n'est pas influencée par le pourcentage variable de cellules NK CD56^{bright} (fluctuant entre 5 et 10% des cellules NK circulantes). Ce sous-type de cellules NK, minoritaire dans le sang périphérique, étant classiquement associé à une plus abondante production de cytokines (9). La fluctuation de leur faible pourcentage parmi les cellules NK du sang périphérique n'explique d'ailleurs pas non plus la variabilité de la réponse cytotoxique.

On peut également supposer que cette difficulté à établir un lien entre le phénotype NKp30 et la production de cytokines soit liée à la taille de l'échantillon (seulement une vingtaine

d'individus au total pour l'étude fonctionnelle). Il est donc indispensable d'augmenter le nombre d'individus inclus dans ce test afin de pouvoir conforter ces premiers résultats.

Comme cela a été mis en évidence dans l'étude des phénotypes NCR^{dull} chez des patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique (LAM) par RT. Costello et al. (132), nous avons confirmé chez les sujets sains la corrélation entre l'expression de NKp30 et celle de NKp46 à la surface des cellules NK *ex vivo*. NKp46 semble d'ailleurs être un facteur plus important que NKp30 lui-même dans la réponse cytotoxique CD107a. Au contraire, l'expression de NKG2D n'apparaît pas primordiale dans nos conditions expérimentales.

La corrélation entre l'expression de NKp30 et NKp46 que nous avons observée a également été répliquée dans un autre groupe de donneurs sains par l'équipe du Dr. A.Caignard avec laquelle nous collaborons. Cette corrélation est, de façon intéressante, perdue chez patients atteints de mélanome. Cette perte de corrélation est sans doute associée à la diminution d'expression de NKp46 sans modulation de celle de NKp30 chez ces patients (374).

A la suite de la démonstration du rôle du récepteur activateur NKp46 dans la maturation des cellules NK murines par E. Narni-Mancinelli et al. (305), on pourrait penser que la corégulation de l'expression des gènes NCR1 et NCR3 provient d'un évènement ayant lieu au niveau transcriptionnel. Cependant, l'analyse des données publiques d'une puce d'expression (365) suggère qu'il est peu probable que la corégulation soit déterminée à ce stade, les niveaux des transcrits des deux NCRs n'étant pas corrélés. En revanche, un mécanisme post-transcriptionnel pourrait expliquer le lien entre la signalisation cytotoxique issue de NKp30 et de NKp46. En effet, un élément commun aux deux voies de signalisation est la molécule CD3 ζ (375). Une quantité limitée de cet adaptateur moléculaire pourrait en effet déterminer un ajustement fin de ses interactions avec l'un ou l'autre des NCRs, expliquer l'excellente corrélation de l'expression membranaire des deux NCRs et contrôler par conséquent la voie de signalisation aboutissant à la fonction cytotoxique (376). Nous pensons évaluer cette hypothèse rapidement par marquage cellulaire de CD3 ζ . Enfin, le gène codant CD3 ζ présente lui-même un important polymorphisme et a été impliqué dans la prédisposition à la sclérodermie, à la polyarthrite rhumatoïde et à la maladie cœliaque.

Le fait que NKG2D utilise un autre adaptateur moléculaire que CD3 ζ (DAP10) est une explication plausible aux faibles corrélations observées avec les autres NCRs (282). La clarification des interrelations entre NKRs dans l'activation de la fonction NK, en regard des polymorphismes de ces récepteurs, nécessiterait de plus amples investigations fonctionnelles avec par exemple l'ajout, dans les puits de stimulation avec l'anti-NKp30, des anticorps bloquant les signalisations issues de NKp46 et NKG2D.

Les corrélations observées entre les cytokines produites en réponse à l'engagement du récepteurs NKp30, en particulier entre l'IFN γ et le GM-CSF soutiennent l'hypothèse d'un contrôle commun de ces sécrétions. Bien que ces taux de cytokines sécrétées soient également corrélés à la cytotoxicité, ils sont totalement indépendants de l'expression membranaire de NKp30 (et de NKp46). Ceci révèle un degré supplémentaire de complexité dans le patron d'expression des gènes impliqués dans la fonction NK. Cette hypothèse est en

accord avec une récente étude démontrant que la voie de sécrétion de cytokines comme l'IFN γ ou le TNF α passe par un chemin intracellulaire indépendant de celui de la perforine (377).

Cette différence de corrélation (à l'expression de NKp30) entre les deux grandes fonctions NK peut aussi être liée à la répartition inégale entre la proportion de cellules NK CD56^{dim}, majoritaires (90% des NK) dans le sang périphérique humain et décrites comme les meilleures actrices de la cytotoxicité, et celle des CD56^{bright} minoritaires (10% des NK) et associées à la fonction de production de cytokines (9). Comme il y a plus de cellules CD56^{dim} dans la population stimulée *in vitro*, la réponse la plus facilement mesurable et comparable est donc sans surprise la cytotoxicité. La stimulation *in vitro* de chacune des sous-populations NK séparées devrait nous apporter des éléments de réponse à cet effet. Un phénotypage plus précis de ces deux sous-populations avec des marqueurs supplémentaires pourrait également nous aider à mieux distinguer le rôle de chacune d'entre elles dans la fonction NK observée en réponse à la stimulation NKp30 comme CD25 (ou IL-2R α) exprimé en grande quantité sur les cellules CD56^{bright} et CD16, autre marqueur important des cellules CD56^{dim} (Fig.2 de l'introduction).

Pour conclure, avec ce modèle d'étude de l'activation et de la fonction des cellules NK par le biais du récepteur NKp30, nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois et chez des individus sains, une relation entre un polymorphisme génétique *en cis*, la variation d'expression des transcrits du gène, l'exposition de la protéine à la membrane cellulaire et la fonction spécifique de cette lignée de lymphocytes. Néanmoins, on ne peut exclure une régulation par d'autres éléments, situés *en trans* comme des facteurs de transcription qui pourraient d'ailleurs nous éclairer sur le lien entre les récepteurs NKp30 et NKp46. Cette question mérite d'être approfondie par des analyses à plus grande échelle avec le balayage du transcriptome NK par puces. Ce projet qui va être développé par la suite dans notre équipe consistera donc en l'analyse globale des interrelations entre NKRs par la reconstitution des réseaux de gènes mis en jeu pendant l'activation des cellules NK et reposera en partie sur des analyses transcriptomiques.

Nous avons par ailleurs pu remarquer la difficulté avec laquelle il est possible d'établir une relation aussi claire entre transcrits et protéines/fonction qu'entre génotype et transcrits. Il semble donc essentiel de décrypter les règles régissant l'expression des protéines à la membrane et leur conséquence sur la réponse fonctionnelle afin de pouvoir par la suite élucider les liens entre génotypes, transcrits et fonction d'un gène donné.

Le travail que j'ai accompli dans cette partie de ma thèse a donc permis de montrer qu'il est possible de mettre en évidence différents niveaux de corrélations dans les nombreuses étapes se succédant du gène à la fonction cellulaire. Ces résultats incitent à mettre en place une étude à grande échelle de la biologie intégrative des cellules NK, cherchant à relier le polymorphisme des gènes, l'expression quantitative des transcrits et des protéines aux fonctions cellulaires. Une limite d'une telle étude réside dans le fait que

nous n'avons accès, la plupart du temps, qu'aux cellules du sang périphérique or il serait passionnant de pouvoir analyser la fonction des cellules NK tissulaires dont le phénotype et la fonction varient selon les sites.

Les résultats obtenus, permettent d'établir un niveau de référence de la variabilité de la réponse NK qui pourrait avoir des applications dans diverses pathologies. Dans ce but, nous avons travaillé sur un exemple de MAI où le principal mécanisme auto-immun a été identifié (la production d'auto-anticorps dirigés contre l'RACH) : la myasthénie auto-immune (MG). Nous avons par ailleurs développé une collaboration avec l'équipe du Dr A.Caignard afin d'évaluer le rôle du nouveau SNP NCR3 que nous avons identifié dans le mélanome.

La seconde partie de mon projet de thèse consistait en la recherche de variants de NCR3 dans un contexte pathologique : la Myasthénie auto-immune (MG)

NCR3 est un gène localisé dans la région des gènes extrêmement polymorphes du CMH. En effet, il se situe dans le bras court du chromosome 6 au niveau du CMH de classe III. Une centaine de SNPs ont été identifiés jusqu'à présent, dans et à proximité du gène NCR3 dont 39 ont été validés par le projet « 1000 Génomes ». (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap/PheGenI?chr=6&from=31556659&to=31560761&fromto=31556659+31560761&tab=0#pgSNP>). Jusqu'à présent, seulement deux SNPs de NCR3 ont été associés à des pathologies. Le premier SNP du gène NCR3 à avoir été associé à la prédisposition à une pathologie est le SNP rs2736191, situé dans le promoteur du gène NCR3, dont l'allèle mineur est retrouvé plus fréquemment chez les patients atteints de paludisme (209). Le second SNP, rs986475, situé dans la région 3'UTR (dans le site du signal de polyadénylation 2), a été associé à un facteur de mauvaise réponse au traitement à l'Imatinib chez des patients atteints de sarcome gastrointestinal (GIST) (315). Les remarquables travaux de l'équipe de L. Zitvogel ont permis d'associer chacune des trois formes majoritaires de NKp30 (a, b et c), issues de l'épissage alternatif du dernier exon de NCR3, à 3 types de réponse fonctionnelle NK. La forme NKp30a est associée à la production de cytokines et à la cytotoxicité, la forme NKp30b induit uniquement la production de cytokines pro-inflammatoires et enfin la forme NKp30c a plutôt un profil immunosuppresseur avec l'induction de la sécrétion d'IL-10. L'allèle mineur du SNP rs986475 est retrouvé plus fréquemment chez les patients « mauvais répondeurs » au traitement Imatinib dont les cellules NK expriment majoritairement la forme immunosuppressive de NKp30 (NKp30c) (315).

La mise en évidence de SNPs différents d'un même gène associés à deux conditions pathologiques (tumeur/infection parasitaire) révèle toute la complexité des mécanismes de régulation de l'expression des gènes.

Au-delà du rôle bien établi des cellules NK dans l'immunité anti-tumorale et anti-infectieuse, un intérêt croissant est porté à leur contribution au développement des MAI. Leur rôle est ainsi suspecté dans la myasthénie auto-immune, MAI rare touchant la jonction neuro-musculaire et caractérisée par la production d'auto-anticorps généralement dirigés contre le

RACH. En effet, les cellules NK, notamment la sous-population CD56^{dim}, sont significativement moins nombreuses dans le sang circulant des patients (comparés à des contrôles sains) et leur nombre se normalise sous l'effet du traitement (378). Dans le modèle murin de myasthénie autoimmune expérimentale, les cellules NK jouent un rôle indispensable dans la production des autoanticorps en facilitant la polarisation Th1 des cellules qui coopèrent avec les cellules autoréactives (245).

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au récepteur activateur NCR3/NKp30 pour plusieurs raisons. Tout d'abord, son expression est significativement accrue dans le liquide synovial de patients atteints d'une autre maladie autoimmune, la PR, et cette augmentation est corrélée à l'intensité de l'inflammation synoviale (379). La PR est d'ailleurs une pathologie proche de la myasthénie qui lui est souvent associée et a une composante humorale importante dans son étiologie, avec la présence de centres germinatifs ectopiques, ainsi qu'une association commune à la région centrale du CMH dont fait partie le gène NCR3. Ensuite, l'importance de NKp30 dans l'interaction NK/DC (avec induction de la lyse ou de la maturation des iDC) constitue un autre argument pour le rôle des cellules NK dans l'autoimmunité (avec une répercussion sur l'activation des LT CD4⁺ indispensable à celle des LB producteurs d'autoanticorps, par exemple). Enfin, la localisation du gène NCR3, entre deux marqueurs microsatellites fortement associés à la MG (TNFd et D6S2788), représente un troisième argument en la faveur d'un rôle de ce gène dans l'étiologie de cette pathologie.

Existe-t-il des variants de NCR3 potentiellement associés à la MG ?

Après examen détaillé de la majeure partie du gène NCR3 par re-séquençage sur 133 patients myasthéniques et 100 contrôles nous n'avons trouvé aucune association entre un SNP fréquent de NCR3 et la MG.

Par contre, nous avons pu mettre en évidence 2 variants rares (MAF<2%) retrouvés uniquement chez les patients myasthéniques et pas dans notre échantillon contrôle ni dans les 1092 individus du projet « 1000 Génomes ». Ces deux mutations situées aux positions 31,556,873 et 31,557,891 du chromosome 6 changent une histidine en tyrosine en position 193 (H193Y) et une leucine en arginine en position 19 (L19R), respectivement. Autant la première mutation, H193Y, semble avoir un effet négligeable, autant la seconde, L19R, détectée chez deux patients non apparentés, est prédite comme délétère selon deux algorithmes différents et retient donc toute notre attention.

Afin de confirmer et préciser l'impact éventuel de ces mutations dans la MG, nous souhaiterions tester l'expression membranaire de NKp30 et la fonctionnalité des cellules NK des patients porteurs de ces variants rares, en réponse à la stimulation de NKp30. Dans l'attente de cette validation fonctionnelle, nos résultats soutiennent l'hypothèse d'un rôle des cellules NK dans les anomalies de régulation propices au développement de cette MAI au moins chez certains patients myasthéniques.

A cet égard, il serait intéressant de préciser le phénotype des cellules NK thymiques chez les patients myasthéniques. En effet, comme nous l'avons discuté, les cellules NK n'ont pas le même phénotype entre le sang périphérique, où sont effectuées la majorité des études chez l'Homme, et les sites où elles peuvent jouer un rôle pathogène ou protecteur. Or, le thymus joue un rôle certainement important dans la genèse de la MG. Il est un site majeur de production des autoanticorps et vraisemblablement le site d'initiation de la réaction autoimmune.

Les cellules NK thymiques pourraient ainsi jouer un rôle spécifique dans la pathogénèse de la MG avec TFH. Elles pourraient notamment :

- influencer la formation des centres germinatifs, où les LB spécifiques du RACH sont activés, par la production de $TNF\alpha$ ou de $LT\alpha$ (108),
- influencer la maturation des DC (l'absence de lyse des DC trop inflammatoires pourrait favoriser l'activation des $T\ CD4^+$ aidant à l'activation des LB) (245),
- interagir directement avec les LT (137).

L'étude de ces mécanismes est rendue possible par le fait que l'ablation du thymus est une des principales options thérapeutiques dans la myasthénie des sujets jeunes.

Il serait également particulièrement intéressant d'appliquer les analyses des relations génotype-transcrits-phénotype-fonction faites chez les individus sains dans le cadre de cette autre MAI, souvent associée à la MG et où l'implication de NKp30 a déjà été rapportée, qu'est la PR avec un examen simultané des cellules NK dans le sang périphérique et dans le tissu cible, la synoviale.

Autre application de cette nouvelle méthode d'analyse des mécanismes de régulation de l'expression de gènes dans le mélanome ?

L'étude de la fonction des cellules NK reste fortement associée à celle des mécanismes de défense anti-tumoraux, c'est pourquoi nous avons développé une collaboration avec l'équipe du Dr. A. Caignard (de l'Institut Cochin) qui étudie le phénotype et la fonction des cellules NK aux différents stades du mélanome cutané, afin d'évaluer l'intérêt de notre approche dans cette tumeur maligne. L'équipe de A. Caignard a, en outre, récemment mis en évidence l'implication de NKG2D, des NCRs et de DNAM-1 dans la lyse des cellules de mélanome médiée par les cellules NK. Il est à noter que les cellules NK de patients atteints de mélanome au stade IV expriment moins de NKp46 à leur surface que les donneurs sains. Ce défaut d'expression est cependant résolu après traitement par chimiothérapie (374). L'observation de la corrélation entre l'expression de NKp30 et NKp46 chez les donneurs sains est perdue chez les patients mélanome de stade IV mais réapparaît après chimiothérapie. L'analyse plus en détail du lien présent entre ces deux NCRs revêt donc un grand intérêt dans l'étude des mécanismes régulant l'interaction cellules NK / Cellules tumorales.

Les résultats préliminaires, obtenus dans ce projet « NCR3-Mélanome », avec le génotypage des SNPs NCR3 chez les patients atteints de mélanome (tout stades confondus : stade I à IV

et « long-répondeurs »), sont pour le moins intrigants et révèlent que l'allèle mineur de rs11575842 est retrouvé chez deux fois plus d'individus atteints de mélanome que chez nos donneurs de sang et que les cellules NK de ces patients exerceraient une plus forte cytotoxicité après stimulation *in vitro* avec le récepteur NKp30. Ces résultats, portant sur peu d'individus et issus d'une étude de la réponse NK après stimulation de PBMC (et non de cellules NK enrichies) méritent d'être approfondis avec un plus grand nombre d'individus et un test fonctionnel après enrichissement en cellules NK.

Cette deuxième partie de notre travail attire l'attention sur les lymphocytes NK comme des acteurs importants dans des mécanismes pathogènes diversifiés (tumeurs, infections et auto-immunité). Une meilleure compréhension des systèmes de régulation de la fonction NK au regard des polymorphismes des gènes codant les différents récepteurs NK et de l'expression de ces gènes devrait être désormais possible grâce aux méthodes de la biologie haut-débit. Elle devrait permettre de mieux cerner la prédisposition individuelle à développer certaines des pathologies impliquant les cellules NK et pourrait également orienter les recherches sur des immunothérapies efficaces basées sur ces cellules.

BIBLIOGRAPHIE

References

1. Herberman, R. B., M. E. Nunn, and D. H. Lavrin. 1975. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* 16:216-229.
2. Kiessling, R., E. Klein, H. Pross, and H. Wigzell. 1975. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 5:117-121.
3. Karre, K., H. G. Ljunggren, G. Piontek, and R. Kiessling. 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319:675-678.
4. Karlhofer, F. M., R. K. Ribaudo, and W. M. Yokoyama. 1992. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* 358:66-70.
5. Kim, S., J. Poursine-Laurent, S. M. Truscott, L. Lybarger, Y. J. Song, L. Yang, A. R. French, J. B. Sunwoo, S. Lemieux, T. H. Hansen, and W. M. Yokoyama. 2005. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 436:709-713.
6. Lanier, L. L., R. Testi, J. Bindl, and J. H. Phillips. 1989. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 169:2233-2238.
7. Emmons, S. L., and S. B. Pollack. 1985. Murine NK cell heterogeneity: subpopulations of C57BL/6 splenic NK cells detected by NK-1.1 and NK-2.1 antisera. *Nat Immun Cell Growth Regul* 4:169-177.
8. Poli, A., T. Michel, M. Theresine, E. Andres, F. Hentges, and J. Zimmer. 2009. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 126:458-465.
9. Cooper, M. A., T. A. Fehniger, S. C. Turner, K. S. Chen, B. A. Ghaheri, T. Ghayur, W. E. Carson, and M. A. Caligiuri. 2001. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97:3146-3151.
10. Mavilio, D., G. Lombardo, J. Benjamin, D. Kim, D. Follman, E. Marcenaro, M. A. O'Shea, A. Kinter, C. Kovacs, A. Moretta, and A. S. Fauci. 2005. Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2886-2891.
11. Walzer, T., M. Blery, J. Chaix, N. Fuseri, L. Chasson, S. H. Robbins, S. Jaeger, P. Andre, L. Gauthier, L. Daniel, K. Chemin, Y. Morel, M. Dalod, J. Imbert, M. Pierres, A. Moretta, F. Romagne, and E. Vivier. 2007. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3384-3389.
12. Gregoire, C., L. Chasson, C. Luci, E. Tomasello, F. Geissmann, E. Vivier, and T. Walzer. 2007. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* 220:169-182.
13. Meresse, B., S. A. Curran, C. Ciszewski, G. Orbelyan, M. Setty, G. Bhagat, L. Lee, M. Tretiakova, C. Semrad, E. Kistner, R. J. Winchester, V. Braud, L. L. Lanier, D. E. Geraghty, P. H. Green, S. Guandalini, and B. Jabri. 2006. Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med* 203:1343-1355.
14. Lanier, L. L., A. M. Le, C. I. Civin, M. R. Loken, and J. H. Phillips. 1986. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 136:4480-4486.
15. Robertson, M. J. 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 71:173-183.

16. Ferlazzo, G., D. Thomas, S. L. Lin, K. Goodman, B. Morandi, W. A. Muller, A. Moretta, and C. Munz. 2004. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 172:1455-1462.
17. Fehniger, T. A., M. A. Cooper, G. J. Nuovo, M. Cella, F. Facchetti, M. Colonna, and M. A. Caligiuri. 2003. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 101:3052-3057.
18. Doherty, D. G., and C. O'Farrelly. 2000. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev* 174:5-20.
19. Gao, B., S. Radaeva, and O. Park. 2009. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *J Leukoc Biol* 86:513-528.
20. Pillarisetty, V. G., S. C. Katz, J. I. Bleier, A. B. Shah, and R. P. Dematteo. 2005. Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN-gamma via autocrine IL-12. *J Immunol* 174:2612-2618.
21. Chan, C. W., E. Crafton, H. N. Fan, J. Flook, K. Yoshimura, M. Skarica, D. Brockstedt, T. W. Dubensky, M. F. Stins, L. L. Lanier, D. M. Pardoll, and F. Housseau. 2006. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 12:207-213.
22. Vosshenrich, C. A., S. Lesjean-Pottier, M. Hasan, O. Richard-Le Goff, E. Corcuff, O. Mandelboim, and J. P. Di Santo. 2007. CD11cIb220+ interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells. *J Exp Med* 204:2569-2578.
23. Culley, F. J. 2009. Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. *Immunology* 128:151-163.
24. Robinson, B. W., P. Pinkston, and R. G. Crystal. 1984. Natural killer cells are present in the normal human lung but are functionally impotent. *J Clin Invest* 74:942-950.
25. Ebert, L. M., S. Meuter, and B. Moser. 2006. Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance. *J Immunol* 176:4331-4336.
26. Manaster, I., S. Mizrahi, D. Goldman-Wohl, H. Y. Sela, N. Stern-Ginossar, D. Lankry, R. Gruda, A. Hurwitz, Y. Bdolah, R. Haimov-Kochman, S. Yagel, and O. Mandelboim. 2008. Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. *J Immunol* 181:1869-1876.
27. Kopcow, H. D., D. S. Allan, X. Chen, B. Rybalov, M. M. Andzelm, B. Ge, and J. L. Strominger. 2005. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15563-15568.
28. Leon, F., E. Roldan, L. Sanchez, C. Camarero, A. Bootello, and G. Roy. 2003. Human small-intestinal epithelium contains functional natural killer lymphocytes. *Gastroenterology* 125:345-356.
29. Yokoyama, W. M., S. Kim, and A. R. French. 2004. The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 22:405-429.
30. Kondo, M., I. L. Weissman, and K. Akashi. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91:661-672.
31. Perez, S. A., P. A. Sotiropoulou, D. G. Gkika, L. G. Mahaira, D. K. Niarchos, A. D. Gritzapis, Y. G. Kavalakis, A. I. Antsaklis, C. N. Baxevanis, and M. Papamichail. 2003. A novel myeloid-like NK cell progenitor in human umbilical cord blood. *Blood* 101:3444-3450.
32. Grzywacz, B., N. Kataria, N. Kataria, B. R. Blazar, J. S. Miller, and M. R. Verneris. 2011. Natural killer-cell differentiation by myeloid progenitors. *Blood* 117:3548-3558.
33. Mrozek, E., P. Anderson, and M. A. Caligiuri. 1996. Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87:2632-2640.

34. Yu, H., T. A. Fehniger, P. Fuchshuber, K. S. Thiel, E. Vivier, W. E. Carson, and M. A. Caligiuri. 1998. Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* 92:3647-3657.
35. Ranson, T., C. A. Vosshenrich, E. Corcuff, O. Richard, W. Muller, and J. P. Di Santo. 2003. IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood* 101:4887-4893.
36. Haller, O., and H. Wigzell. 1977. Suppression of natural killer cell activity with radioactive strontium: effector cells are marrow dependent. *J Immunol* 118:1503-1506.
37. Miller, J. S., C. Verfaillie, and P. McGlave. 1992. The generation of human natural killer cells from CD34+/DR- primitive progenitors in long-term bone marrow culture. *Blood* 80:2182-2187.
38. Miller, J. S., K. A. Alley, and P. McGlave. 1994. Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34+7+ NK progenitor. *Blood* 83:2594-2601.
39. Vosshenrich, C. A., M. E. Garcia-Ojeda, S. I. Samson-Villeger, V. Pasqualetto, L. Enault, O. Richard-Le Goff, E. Corcuff, D. Guy-Grand, B. Rocha, A. Cumano, L. Rogge, S. Ezine, and J. P. Di Santo. 2006. A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat Immunol* 7:1217-1224.
40. Hidalgo, L., V. G. Martinez, J. Valencia, C. Hernandez-Lopez, M. N. Vazquez, J. R. Nunez, A. G. Zapata, R. Sacedon, A. Varas, and A. Vicente. 2012. Expression of BMPRIA on human thymic NK cell precursors: role of BMP signaling in intrathymic NK cell development. *Blood* 119:1861-1871.
41. Huntington, N. D., C. A. Vosshenrich, and J. P. Di Santo. 2007. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat Rev Immunol* 7:703-714.
42. Anfossi, N., P. Andre, S. Guia, C. S. Falk, S. Roetyncck, C. A. Stewart, V. Breso, C. Frassati, D. Reviron, D. Middleton, F. Romagne, S. Ugolini, and E. Vivier. 2006. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25:331-342.
43. Hayakawa, Y., and M. J. Smyth. 2006. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol* 176:1517-1524.
44. Freud, A. G., and M. A. Caligiuri. 2006. Human natural killer cell development. *Immunol Rev* 214:56-72.
45. Romagnani, C., K. Juelke, M. Falco, B. Morandi, A. D'Agostino, R. Costa, G. Ratto, G. Forte, P. Carrega, G. Lui, R. Conte, T. Strowig, A. Moretta, C. Munz, A. Thiel, L. Moretta, and G. Ferlazzo. 2007. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* 178:4947-4955.
46. Weng, N. P., B. L. Levine, C. H. June, and R. J. Hodes. 1995. Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11091-11094.
47. Chan, A., D. L. Hong, A. Atzberger, S. Kollnberger, A. D. Filer, C. D. Buckley, A. McMichael, T. Enver, and P. Bowness. 2007. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* 179:89-94.
48. Yu, J., H. C. Mao, M. Wei, T. Hughes, J. Zhang, I. K. Park, S. Liu, S. McClory, G. Marcucci, R. Trotta, and M. A. Caligiuri. 2010. CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. *Blood* 115:274-281.
49. Beziat, V., B. Descours, C. Parizot, P. Debre, and V. Vieillard. 2010. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One* 5:e11966.
50. Lopez-Verges, S., J. M. Milush, S. Pandey, V. A. York, J. Arakawa-Hoyt, H. Pircher, P. J. Norris, D. F. Nixon, and L. L. Lanier. 2010. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* 116:3865-3874.

51. Barton, K., N. Muthusamy, C. Fischer, C. N. Ting, T. L. Walunas, L. L. Lanier, and J. M. Leiden. 1998. The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity* 9:555-563.
52. Colucci, F., S. I. Samson, R. P. DeKoter, O. Lantz, H. Singh, and J. P. Di Santo. 2001. Differential requirement for the transcription factor PU.1 in the generation of natural killer cells versus B and T cells. *Blood* 97:2625-2632.
53. Lacorazza, H. D., Y. Miyazaki, A. Di Cristofano, A. Deblasio, C. Hedvat, J. Zhang, C. Cordon-Cardo, S. Mao, P. P. Pandolfi, and S. D. Nimer. 2002. The ETS protein MEF plays a critical role in perforin gene expression and the development of natural killer and NK-T cells. *Immunity* 17:437-449.
54. Carotta, S., A. Dakic, A. D'Amico, S. H. Pang, K. T. Greig, S. L. Nutt, and L. Wu. 2010. The transcription factor PU.1 controls dendritic cell development and Flt3 cytokine receptor expression in a dose-dependent manner. *Immunity* 32:628-641.
55. Gascoyne, D. M., E. Long, H. Veiga-Fernandes, J. de Boer, O. Williams, B. Seddon, M. Coles, D. Kioussis, and H. J. Brady. 2009. The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. *Nat Immunol* 10:1118-1124.
56. Kamizono, S., G. S. Duncan, M. G. Seidel, A. Morimoto, K. Hamada, G. Grosveld, K. Akashi, E. F. Lind, J. P. Haight, P. S. Ohashi, A. T. Look, and T. W. Mak. 2009. Nfil3/E4bp4 is required for the development and maturation of NK cells in vivo. *J Exp Med* 206:2977-2986.
57. Kee, B. L. 2009. E and ID proteins branch out. *Nat Rev Immunol* 9:175-184.
58. Boos, M. D., Y. Yokota, G. Eberl, and B. L. Kee. 2007. Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *J Exp Med* 204:1119-1130.
59. Georgopoulos, K., D. D. Moore, and B. Derfler. 1992. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science* 258:808-812.
60. Morgan, B., L. Sun, N. Avitahl, K. Andrikopoulos, T. Ikeda, E. Gonzales, P. Wu, S. Neben, and K. Georgopoulos. 1997. Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *Embo J* 16:2004-2013.
61. Payne, K. J., G. Huang, E. Sahakian, J. Y. Zhu, N. S. Barteneva, L. W. Barsky, M. A. Payne, and G. M. Crooks. 2003. Ikaros isoform x is selectively expressed in myeloid differentiation. *J Immunol* 170:3091-3098.
62. Townsend, M. J., A. S. Weinmann, J. L. Matsuda, R. Salomon, P. J. Farnham, C. A. Biron, L. Gapin, and L. H. Glimcher. 2004. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity* 20:477-494.
63. Gordon, S. M., J. Chaix, L. J. Rupp, J. Wu, S. Madera, J. C. Sun, T. Lindsten, and S. L. Reiner. 2012. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity* 36:55-67.
64. Li, P., S. Burke, J. Wang, X. Chen, M. Ortiz, S. C. Lee, D. Lu, L. Campos, D. Goulding, B. L. Ng, G. Dougan, B. Huntly, B. Gottgens, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, F. Colucci, and P. Liu. 2010. Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion. *Science* 329:85-89.
65. Lanier, L. L. 2008. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9:495-502.
66. Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M. C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 19:197-223.
67. Orr, M. T., and L. L. Lanier. 2010. Natural killer cell education and tolerance. *Cell* 142:847-856.
68. Yokoyama, W. M., and S. Kim. 2006. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev* 214:143-154.

69. Hoglund, P., and P. Brodin. 2010. Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat Rev Immunol* 10:724-734.
70. Raulet, D. H., and R. E. Vance. 2006. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 6:520-531.
71. Back, J., E. L. Malchiodi, S. Cho, L. Scarpellino, P. Schneider, M. C. Kerzic, R. A. Mariuzza, and W. Held. 2009. Distinct conformations of Ly49 natural killer cell receptors mediate MHC class I recognition in trans and cis. *Immunity* 31:598-608.
72. Joncker, N. T., N. C. Fernandez, E. Treiner, E. Vivier, and D. H. Raulet. 2009. NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. *J Immunol* 182:4572-4580.
73. Jonsson, A. H., L. Yang, S. Kim, S. M. Taffner, and W. M. Yokoyama. 2010. Effects of MHC class I alleles on licensing of Ly49A+ NK cells. *J Immunol* 184:3424-3432.
74. Fernandez, N. C., E. Treiner, R. E. Vance, A. M. Jamieson, S. Lemieux, and D. H. Raulet. 2005. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* 105:4416-4423.
75. Yawata, M., N. Yawata, M. Draghi, F. Partheniou, A. M. Little, and P. Parham. 2008. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood* 112:2369-2380.
76. Champsaur, M., and L. L. Lanier. 2010. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev* 235:267-285.
77. Orr, M. T., W. J. Murphy, and L. L. Lanier. 2010. 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat Immunol* 11:321-327.
78. Fauriat, C., M. A. Ivarsson, H. G. Ljunggren, K. J. Malmberg, and J. Michaelsson. 2010. Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood* 115:1166-1174.
79. Sun, J. C. 2010. Re-educating natural killer cells. *J Exp Med* 207:2049-2052.
80. Sun, J. C., S. Lopez-Verges, C. C. Kim, J. L. DeRisi, and L. L. Lanier. 2011. NK cells and immune "memory". *J Immunol* 186:1891-1897.
81. Sun, J. C., J. N. Beilke, and L. L. Lanier. 2009. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 457:557-561.
82. Vivier, E., D. H. Raulet, A. Moretta, M. A. Caligiuri, L. Zitvogel, L. L. Lanier, W. M. Yokoyama, and S. Ugolini. 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331:44-49.
83. Cooper, M. A., M. Colonna, and W. M. Yokoyama. 2009. Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *EMBO Rep* 10:1103-1110.
84. O'Leary, J. G., M. Goodarzi, D. L. Drayton, and U. H. von Andrian. 2006. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* 7:507-516.
85. Cooper, M. A., J. M. Elliott, P. A. Keyel, L. Yang, J. A. Carrero, and W. M. Yokoyama. 2009. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1915-1919.
86. Guma, M., A. Angulo, C. Vilches, N. Gomez-Lozano, N. Malats, and M. Lopez-Botet. 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104:3664-3671.
87. Kuijpers, T. W., P. A. Baars, C. Dantin, M. van den Burg, R. A. van Lier, and E. Roosnek. 2008. Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood* 112:914-915.
88. Sun, J. C., and L. L. Lanier. 2009. The Natural Selection of Herpesviruses and Virus-Specific NK Cell Receptors. *Viruses* 1:362.
89. Bjorkstrom, N. K., T. Lindgren, M. Stoltz, C. Fauriat, M. Braun, M. Evander, J. Michaelsson, K. J. Malmberg, J. Klingstrom, C. Ahlm, and H. G. Ljunggren. 2010. Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med* 208:13-21.

90. Trapani, J. A., and M. J. Smyth. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2:735-747.
91. van den Broek, M. E., D. Kagi, F. Ossendorp, R. Toes, S. Vamvakas, W. K. Lutz, C. J. Melief, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1996. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* 184:1781-1790.
92. Cartron, G., L. Dacheux, G. Salles, P. Solal-Celigny, P. Bardos, P. Colombat, and H. Watier. 2002. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99:754-758.
93. Hatjiharissi, E., L. Xu, D. D. Santos, Z. R. Hunter, B. T. Ciccarelli, S. Verselis, M. Modica, Y. Cao, R. J. Manning, X. Leleu, E. A. Dimmock, A. Kortsaris, C. Mitsiades, K. C. Anderson, E. A. Fox, and S. P. Treon. 2007. Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the FcγRIIIa-158 V/V and V/F polymorphism. *Blood* 110:2561-2564.
94. Ljunggren, H. G., and K. Karre. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11:237-244.
95. Leibson, P. J. 1997. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* 6:655-661.
96. Nagler, A., L. L. Lanier, S. Cwirla, and J. H. Phillips. 1989. Comparative studies of human FcγRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 143:3183-3191.
97. Aktas, E., U. C. Kucuksezer, S. Bilgic, G. Erten, and G. Deniz. 2009. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol* 254:149-154.
98. Alter, G., J. M. Malenfant, and M. Altfeld. 2004. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294:15-22.
99. Zimmer, J., E. Andres, and F. Hentges. 2005. NK cell subsets and CD107a mobilization assay. *Leukemia* 19:1849-1851; author reply 1857.
100. Betts, M. R., J. M. Brexchley, D. A. Price, S. C. De Rosa, D. C. Douek, M. Roederer, and R. A. Koup. 2003. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 281:65-78.
101. Al-Hubeshy, Z. B., A. Coleman, M. Nelson, and M. R. Goodier. 2011. A rapid method for assessment of natural killer cell function after multiple receptor crosslinking. *J Immunol Methods* 366:52-59.
102. Rubio, V., T. B. Stuge, N. Singh, M. R. Betts, J. S. Weber, M. Roederer, and P. P. Lee. 2003. Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nat Med* 9:1377-1382.
103. Penack, O., C. Gentilini, L. Fischer, A. M. Asemisen, C. Scheibenbogen, E. Thiel, and L. Uharek. 2005. CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. *Leukemia* 19:835-840.
104. Lieberman, J. 2010. Anatomy of a murder: how cytotoxic T cells and NK cells are activated, develop, and eliminate their targets. *Immunol Rev* 235:5-9.
105. Thoren, F. B., R. E. Riise, J. Ousback, M. Della Chiesa, M. Alsterholm, E. Marcenaro, S. Pesce, C. Prato, C. Cantoni, J. Bylund, L. Moretta, and A. Moretta. 2012. Human NK Cells induce neutrophil apoptosis via an NKp46- and Fas-dependent mechanism. *J Immunol* 188:1668-1674.
106. Martin-Fontecha, A., L. L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-γ for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5:1260-1265.
107. Schoenborn, J. R., and C. B. Wilson. 2007. Regulation of interferon-γ during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 96:41-101.
108. Matsumoto, M., S. Mariathasan, M. H. Nahm, F. Baranyay, J. J. Peschon, and D. D. Chaplin. 1996. Role of lymphotoxin and the type I TNF receptor in the formation of germinal centers. *Science* 271:1289-1291.

109. Levitt, L. J., A. Nagler, F. Lee, J. Abrams, M. Shatsky, and D. Thompson. 1991. Production of granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor by human natural killer cells. Modulation by the p75 subunit of the interleukin 2 receptor and by the CD2 receptor. *J Clin Invest* 88:67-75.
110. Mehrotra, P. T., R. P. Donnelly, S. Wong, H. Kanegane, A. Geremew, H. S. Mostowski, K. Furuke, J. P. Siegel, and E. T. Bloom. 1998. Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. *J Immunol* 160:2637-2644.
111. Warren, H. S., B. F. Kinnear, J. H. Phillips, and L. L. Lanier. 1995. Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *J Immunol* 154:5144-5152.
112. Smyth, M. J., C. O. Zachariae, Y. Norihisa, J. R. Ortaldo, A. Hishinuma, and K. Matsushima. 1991. IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets. *J Immunol* 146:3815-3823.
113. Bluman, E. M., K. J. Bartynski, B. R. Avalos, and M. A. Caligiuri. 1996. Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. *J Clin Invest* 97:2722-2727.
114. Cooper, M. A., T. A. Fehniger, and M. A. Caligiuri. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633-640.
115. Cella, M., K. Otero, and M. Colonna. 2010. Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1beta reveals intrinsic functional plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:10961-10966.
116. Trotta, R., R. Parihar, J. Yu, B. Becknell, J. Allard, 2nd, J. Wen, W. Ding, H. Mao, S. Tridandapani, W. E. Carson, and M. A. Caligiuri. 2005. Differential expression of SHIP1 in CD56bright and CD56dim NK cells provides a molecular basis for distinct functional responses to monokine costimulation. *Blood* 105:3011-3018.
117. Bryceson, Y. T., M. E. March, H. G. Ljunggren, and E. O. Long. 2006. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 214:73-91.
118. Carson, W. E., J. G. Giri, M. J. Lindemann, M. L. Linett, M. Ahdieh, R. Paxton, D. Anderson, J. Eisenmann, K. Grabstein, and M. A. Caligiuri. 1994. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 180:1395-1403.
119. Robertson, M. J., T. J. Manley, C. Donahue, H. Levine, and J. Ritz. 1993. Costimulatory signals are required for optimal proliferation of human natural killer cells. *J Immunol* 150:1705-1714.
120. Carson, W. E., M. J. Lindemann, R. Baiocchi, M. Linett, J. C. Tan, C. C. Chou, S. Narula, and M. A. Caligiuri. 1995. The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood* 85:3577-3585.
121. Fujisaki, H., H. Kakuda, N. Shimasaki, C. Imai, J. Ma, T. Lockety, P. Eldridge, W. H. Leung, and D. Campana. 2009. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res* 69:4010-4017.
122. Somanchi, S. S., V. V. Senyukov, C. J. Denman, and D. A. Lee. 2011. Expansion, purification, and functional assessment of human peripheral blood NK cells. *J Vis Exp*.
123. Vitale, M., M. Della Chiesa, S. Carlomagno, D. Pende, M. Arico, L. Moretta, and A. Moretta. 2005. NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 106:566-571.
124. Moretta, L., G. Ferlazzo, C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, M. C. Mingari, and A. Moretta. 2006. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev* 214:219-228.
125. Ferlazzo, G., M. L. Tsang, L. Moretta, G. Melioli, R. M. Steinman, and C. Munz. 2002. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195:343-351.
126. Della Chiesa, M., M. Vitale, S. Carlomagno, G. Ferlazzo, L. Moretta, and A. Moretta. 2003. The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset

- expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol* 33:1657-1666.
127. Pende, D., R. Castriconi, P. Romagnani, G. M. Spaggiari, S. Marcenaro, A. Dondero, E. Lazzeri, L. Lasagni, S. Martini, P. Rivera, A. Capobianco, L. Moretta, A. Moretta, and C. Bottino. 2006. Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood* 107:2030-2036.
 128. Cooper, M. A., T. A. Fehniger, A. Fuchs, M. Colonna, and M. A. Caligiuri. 2004. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol* 25:47-52.
 129. Long, E. O. 2007. Ready for prime time: NK cell priming by dendritic cells. *Immunity* 26:385-387.
 130. Koka, R., P. Burkett, M. Chien, S. Chai, D. L. Boone, and A. Ma. 2004. Cutting edge: murine dendritic cells require IL-15R alpha to prime NK cells. *J Immunol* 173:3594-3598.
 131. Castriconi, R., C. Cantoni, M. Della Chiesa, M. Vitale, E. Marcenaro, R. Conte, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 2003. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4120-4125.
 132. Costello, R. T., S. Sivori, E. Marcenaro, M. Lafage-Pochitaloff, M. J. Mozziconacci, D. Reviron, J. A. Gastaut, D. Pende, D. Olive, and A. Moretta. 2002. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 99:3661-3667.
 133. Fauriat, C., A. Moretta, D. Olive, and R. T. Costello. 2005. Defective killing of dendritic cells by autologous natural killer cells from acute myeloid leukemia patients. *Blood* 106:2186-2188.
 134. Romagnani, C., M. Della Chiesa, S. Kohler, B. Moewes, A. Radbruch, L. Moretta, A. Moretta, and A. Thiel. 2005. Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells. *Eur J Immunol* 35:2452-2458.
 135. Nedvetzki, S., S. Sowinski, R. A. Eagle, J. Harris, F. Vely, D. Pende, J. Trowsdale, E. Vivier, S. Gordon, and D. M. Davis. 2007. Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* 109:3776-3785.
 136. Giuliani, M., J. Giron-Michel, S. Negrini, P. Vacca, D. Durali, A. Caignard, C. Le Bousse-Kerdiles, S. Chouaib, A. Devocelle, R. Bahri, A. Durrbach, Y. Taoufik, S. Ferrini, M. Croce, M. C. Mingari, L. Moretta, and B. Azzarone. 2008. Generation of a novel regulatory NK cell subset from peripheral blood CD34+ progenitors promoted by membrane-bound IL-15. *PLoS One* 3:e2241.
 137. Zingoni, A., T. Sornasse, B. G. Cocks, Y. Tanaka, A. Santoni, and L. L. Lanier. 2004. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol* 173:3716-3724.
 138. Bihl, F., C. Germain, C. Luci, and V. M. Braud. 2011. Mechanisms of NK cell activation: CD4(+) T cells enter the scene. *Cell Mol Life Sci* 68:3457-3467.
 139. Bihl, F., J. Pecheur, B. Breart, G. Poupon, J. Cazareth, V. Julia, N. Glaichenhaus, and V. M. Braud. 2010. Primed antigen-specific CD4+ T cells are required for NK cell activation in vivo upon Leishmania major infection. *J Immunol* 185:2174-2181.
 140. Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini. 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9:503-510.
 141. Sivori, S., M. Falco, M. Della Chiesa, S. Carlomagno, M. Vitale, L. Moretta, and A. Moretta. 2004. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10116-10121.
 142. Caligiuri, M. A., A. Zmuidzinas, T. J. Manley, H. Levine, K. A. Smith, and J. Ritz. 1990. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human

- lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med* 171:1509-1526.
143. Becknell, B., and M. A. Caligiuri. 2005. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol* 86:209-239.
144. Walzer, T., M. Dalod, S. H. Robbins, L. Zitvogel, and E. Vivier. 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106:2252-2258.
145. Fehniger, T. A., M. H. Shah, M. J. Turner, J. B. VanDeusen, S. P. Whitman, M. A. Cooper, K. Suzuki, M. Wechser, F. Goodsaid, and M. A. Caligiuri. 1999. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 162:4511-4520.
146. Rossi, A. R., F. Pericle, S. Rashleigh, J. Janiec, and J. Y. Djeu. 1994. Lysis of neuroblastoma cell lines by human natural killer cells activated by interleukin-2 and interleukin-12. *Blood* 83:1323-1328.
147. Smyth, M. J., N. Y. Crowe, and D. I. Godfrey. 2001. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol* 13:459-463.
148. Malmberg, K. J., Y. T. Bryceson, M. Carlsten, S. Andersson, A. Bjorklund, N. K. Bjorkstrom, B. C. Baumann, C. Fauriat, E. Alici, M. S. Dilber, and H. G. Ljunggren. 2008. NK cell-mediated targeting of human cancer and possibilities for new means of immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 57:1541-1552.
149. Levy, E. M., M. P. Roberti, and J. Mordoh. 2011. Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications. *J Biomed Biotechnol* 2011:676198.
150. Kim, S., K. Iizuka, H. L. Aguila, I. L. Weissman, and W. M. Yokoyama. 2000. In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2731-2736.
151. Velardi, A., L. Ruggeri, A. Mancusi, F. Aversa, and F. T. Christiansen. 2009. Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia. *Curr Opin Immunol* 21:525-530.
152. Ruggeri, L., M. Capanni, E. Urbani, K. Perruccio, W. D. Shlomchik, A. Tosti, S. Posati, D. Rogaia, F. Frassoni, F. Aversa, M. F. Martelli, and A. Velardi. 2002. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295:2097-2100.
153. Savani, B. N., S. Mielke, S. Adams, M. Uribe, K. Rezvani, A. S. Yong, J. Zeilah, R. Kurlander, R. Srinivasan, R. Childs, N. Hensel, and A. J. Barrett. 2007. Rapid natural killer cell recovery determines outcome after T-cell-depleted HLA-identical stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias but not with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 21:2145-2152.
154. Imai, K., S. Matsuyama, S. Miyake, K. Suga, and K. Nakachi. 2000. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356:1795-1799.
155. Coca, S., J. Perez-Piqueras, D. Martinez, A. Colmenarejo, M. A. Saez, C. Vallejo, J. A. Martos, and M. Moreno. 1997. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 79:2320-2328.
156. Ishigami, S., S. Natsugoe, K. Tokuda, A. Nakajo, X. Che, H. Iwashige, K. Aridome, S. Hokita, and T. Aikou. 2000. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 88:577-583.
157. Villegas, F. R., S. Coca, V. G. Villarrubia, R. Jimenez, M. J. Chillon, J. Jareno, M. Zuil, and L. Callol. 2002. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 35:23-28.
158. Takanami, I., K. Takeuchi, and M. Giga. 2001. The prognostic value of natural killer cell infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121:1058-1063.

159. Pierson, B. A., and J. S. Miller. 1996. CD56+bright and CD56+dim natural killer cells in patients with chronic myelogenous leukemia progressively decrease in number, respond less to stimuli that recruit clonogenic natural killer cells, and exhibit decreased proliferation on a per cell basis. *Blood* 88:2279-2287.
160. Tajima, F., T. Kawatani, A. Endo, and H. Kawasaki. 1996. Natural killer cell activity and cytokine production as prognostic factors in adult acute leukemia. *Leukemia* 10:478-482.
161. Fauriat, C., S. Just-Landi, F. Mallet, C. Arnoulet, D. Sainty, D. Olive, and R. T. Costello. 2007. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood* 109:323-330.
162. Konjevic, G., K. Mirjagic Martinovic, A. Vuletic, V. Jovic, V. Jurisic, N. Babovic, and I. Spuzic. 2007. Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. *Clin Exp Metastasis* 24:1-11.
163. Konjevic, G., K. Mirjagic Martinovic, V. Jurisic, N. Babovic, and I. Spuzic. 2009. Biomarkers of suppressed natural killer (NK) cell function in metastatic melanoma: decreased NKG2D and increased CD158a receptors on CD3-CD16+ NK cells. *Biomarkers* 14:258-270.
164. Holtan, S. G., D. J. Creedon, M. A. Thompson, W. K. Nevala, and S. N. Markovic. 2011. Expansion of CD16-negative natural killer cells in the peripheral blood of patients with metastatic melanoma. *Clin Dev Immunol* 2011:316314.
165. Markel, G., R. Seidman, M. J. Besser, N. Zabari, R. Ortenberg, R. Shapira, A. J. Treves, R. Loewenthal, A. Orenstein, A. Nagler, and J. Schachter. 2009. Natural killer lysis receptor (NKLRL)/NKLRL-ligand matching as a novel approach for enhancing anti-tumor activity of allogeneic NK cells. *PLoS One* 4:e5597.
166. Pietra, G., C. Manzini, S. Rivara, M. Vitale, C. Cantoni, A. Petretto, M. Balsamo, R. Conte, R. Benelli, S. Minghelli, N. Solari, M. Gualco, P. Queirolo, L. Moretta, and M. C. Mingari. 2012. Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity. *Cancer Res.*
167. McKay, K., P. C. Moore, B. R. Smoller, and K. M. Hiatt. 2011. Association between natural killer cells and regression in melanocytic lesions. *Hum Pathol* 42:1960-1964.
168. Mamessier, E., A. Sylvain, M. L. Thibault, G. Houvenaeghel, J. Jacquemier, R. Castellano, A. Goncalves, P. Andre, F. Romagne, G. Thibault, P. Viens, D. Birnbaum, F. Bertucci, A. Moretta, and D. Olive. 2011. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest* 121:3609-3622.
169. Garcia-Iglesias, T., A. Del Toro-Arreola, B. Albarran-Somoza, S. Del Toro-Arreola, P. E. Sanchez-Hernandez, M. G. Ramirez-Duenas, L. M. Balderas-Pena, A. Bravo-Cuellar, P. C. Ortiz-Lazareno, and A. Daneri-Navarro. 2009. Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer* 9:186.
170. Gati, A., S. Da Rocha, N. Guerra, B. Escudier, A. Moretta, S. Chouaib, E. Angevin, and A. Caignard. 2004. Analysis of the natural killer mediated immune response in metastatic renal cell carcinoma patients. *Int J Cancer* 109:393-401.
171. Gannon, P. O., A. O. Poisson, N. Delvoye, R. Lapointe, A. M. Mes-Masson, and F. Saad. 2009. Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients. *J Immunol Methods* 348:9-17.
172. Ljunggren, H. G., and K. J. Malmberg. 2007. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* 7:329-339.
173. Atkins, M. B., M. T. Lotze, J. P. Dutcher, R. I. Fisher, G. Weiss, K. Margolin, J. Abrams, M. Sznol, D. Parkinson, M. Hawkins, C. Paradise, L. Kunkel, and S. A. Rosenberg. 1999. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol* 17:2105-2116.

174. Meloni, G., M. Vignetti, E. Pogliani, R. Invernizzi, B. Allione, S. Mirto, S. Sica, F. Leoni, C. Sella, and F. Mandelli. 1997. Interleukin-2 therapy in relapsed acute myelogenous leukemia. *Cancer J Sci Am* 3 Suppl 1:S43-47.
175. Ruggeri, L., A. Mancusi, M. Capanni, M. F. Martelli, and A. Velardi. 2005. Exploitation of alloreactive NK cells in adoptive immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol* 17:211-217.
176. Miller, J. S., Y. Soignier, A. Panoskaltsis-Mortari, S. A. McNearney, G. H. Yun, S. K. Fautsch, D. McKenna, C. Le, T. E. Defor, L. J. Burns, P. J. Orchard, B. R. Blazar, J. E. Wagner, A. Slungaard, D. J. Weisdorf, I. J. Okazaki, and P. B. McGlave. 2005. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 105:3051-3057.
177. Geller, M. A., S. Cooley, P. L. Judson, R. Ghebre, L. F. Carson, P. A. Argenta, A. L. Jonson, A. Panoskaltsis-Mortari, J. Curtsinger, D. McKenna, K. Dusenbery, R. Bliss, L. S. Downs, and J. S. Miller. 2011. A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy* 13:98-107.
178. Romagne, F., and E. Vivier. 2011. Natural killer cell-based therapies. *F1000 Med Rep* 3:9.
179. Romagne, F., P. Andre, P. Spee, S. Zahn, N. Anfossi, L. Gauthier, M. Capanni, L. Ruggeri, D. M. Benson, Jr., B. W. Blaser, M. Della Chiesa, A. Moretta, E. Vivier, M. A. Caligiuri, A. Velardi, and N. Wagtmann. 2009. Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood* 114:2667-2677.
180. Winter, M. C., and B. W. Hancock. 2009. Ten years of rituximab in NHL. *Expert Opin Drug Saf* 8:223-235.
181. Marras, F., F. Bozzano, and A. De Maria. 2011. Involvement of activating NK cell receptors and their modulation in pathogen immunity. *J Biomed Biotechnol* 2011:152430.
182. Quinnan, G. V., and J. E. Manischewitz. 1979. The role of natural killer cells and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med* 150:1549-1554.
183. Brown, M. G., A. O. Dokun, J. W. Heusel, H. R. Smith, D. L. Beckman, E. A. Blattenberger, C. E. Dubbelde, L. R. Stone, A. A. Scalzo, and W. M. Yokoyama. 2001. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 292:934-937.
184. Arase, H., E. S. Mocarski, A. E. Campbell, A. B. Hill, and L. L. Lanier. 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296:1323-1326.
185. Biron, C. A., K. S. Byron, and J. L. Sullivan. 1989. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 320:1731-1735.
186. Lodoen, M., K. Ogasawara, J. A. Hamerman, H. Arase, J. P. Houchins, E. S. Mocarski, and L. L. Lanier. 2003. NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J Exp Med* 197:1245-1253.
187. Dunn, C., N. J. Chalupny, C. L. Sutherland, S. Dosch, P. V. Sivakumar, D. C. Johnson, and D. Cosman. 2003. Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med* 197:1427-1439.
188. Vales-Gomez, M., and H. T. Reyburn. 2006. Intracellular trafficking of the HCMV immunoevasin UL16 depends on elements present in both its cytoplasmic and transmembrane domains. *J Mol Biol* 363:908-917.
189. Arnon, T. I., H. Achdout, O. Levi, G. Markel, N. Saleh, G. Katz, R. Gazit, T. Gonen-Gross, J. Hanna, E. Nahari, A. Porgador, A. Honigman, B. Plachter, D. Mevorach, D. G. Wolf, and O. Mandelboim. 2005. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* 6:515-523.
190. Poli, G., M. Introna, F. Zanaboni, G. Peri, M. Carbonari, F. Aiuti, A. Lazzarin, M. Moroni, and A. Mantovani. 1985. Natural killer cells in intravenous drug abusers with lymphadenopathy syndrome. *Clin Exp Immunol* 62:128-135.

191. Alter, G., N. Teigen, B. T. Davis, M. M. Addo, T. J. Suscovich, M. T. Waring, H. Streeck, M. N. Johnston, K. D. Staller, M. T. Zaman, X. G. Yu, M. Lichterfeld, N. Basgoz, E. S. Rosenberg, and M. Altfeld. 2005. Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood* 106:3366-3369.
192. Brenner, B. G., A. Dascal, R. G. Margolese, and M. A. Wainberg. 1989. Natural killer cell function in patients with acquired immunodeficiency syndrome and related diseases. *J Leukoc Biol* 46:75-83.
193. Lucia, M. B., N. Froio, E. Tacconelli, M. Tumbarello, S. Rutella, C. Rumi, and R. Cauda. 1997. CD16+CD56+CD8+ natural killer (NK) cells are decreased during HIV infection. *Eur J Histochem* 41 Suppl 2:197-198.
194. De Maria, A., M. Fogli, P. Costa, G. Murdaca, F. Puppo, D. Mavilio, A. Moretta, and L. Moretta. 2003. The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKP46, NKP30 and NKP44). *Eur J Immunol* 33:2410-2418.
195. Mavilio, D., J. Benjamin, M. Daucher, G. Lombardo, S. Kottlil, M. A. Planta, E. Marcenaro, C. Bottino, L. Moretta, A. Moretta, and A. S. Fauci. 2003. Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15011-15016.
196. Fogli, M., P. Costa, G. Murdaca, M. Setti, M. C. Mingari, L. Moretta, A. Moretta, and A. De Maria. 2004. Significant NK cell activation associated with decreased cytolytic function in peripheral blood of HIV-1-infected patients. *Eur J Immunol* 34:2313-2321.
197. Amadei, B., S. Urbani, A. Cazaly, P. Fisicaro, A. Zerbini, P. Ahmed, G. Missale, C. Ferrari, and S. I. Khakoo. 2010. Activation of natural killer cells during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology* 138:1536-1545.
198. Dessouki, O., Y. Kamiya, H. Nagahama, M. Tanaka, S. Suzu, Y. Sasaki, and S. Okada. 2010. Chronic hepatitis C viral infection reduces NK cell frequency and suppresses cytokine secretion: Reversion by anti-viral treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 393:331-337.
199. Wen, C., X. He, H. Ma, N. Hou, C. Wei, T. Song, Y. Zhang, L. Sun, Q. Ma, and H. Zhong. 2008. Hepatitis C virus infection downregulates the ligands of the activating receptor NKG2D. *Cell Mol Immunol* 5:475-478.
200. Mandelboim, O., N. Lieberman, M. Lev, L. Paul, T. I. Arnon, Y. Bushkin, D. M. Davis, J. L. Strominger, J. W. Yewdell, and A. Porgador. 2001. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKP46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409:1055-1060.
201. Gazit, R., R. Gruda, M. Elboim, T. I. Arnon, G. Katz, H. Achdout, J. Hanna, U. Qimron, G. Landau, E. Greenbaum, Z. Zakay-Rones, A. Porgador, and O. Mandelboim. 2006. Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene Ncr1. *Nat Immunol* 7:517-523.
202. Jarahian, M., M. Fiedler, A. Cohnen, D. Djandji, G. J. Hammerling, C. Gati, A. Cerwenka, P. C. Turner, R. W. Moyer, C. Watzl, H. Hengel, and F. Momburg. 2011. Modulation of NKP30- and NKP46-mediated natural killer cell responses by poxviral hemagglutinin. *PLoS Pathog* 7:e1002195.
203. Vankayalapati, R., B. Wizel, S. E. Weis, H. Safi, D. L. Lakey, O. Mandelboim, B. Samten, A. Porgador, and P. F. Barnes. 2002. The NKP46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol* 168:3451-3457.
204. Vankayalapati, R., P. Klucar, B. Wizel, S. E. Weis, B. Samten, H. Safi, H. Shams, and P. F. Barnes. 2004. NK cells regulate CD8+ T cell effector function in response to an intracellular pathogen. *J Immunol* 172:130-137.
205. Ma, L. L., C. L. Wang, G. G. Neely, S. Epelman, A. M. Krensky, and C. H. Mody. 2004. NK cells use perforin rather than granulysin for anticryptococcal activity. *J Immunol* 173:3357-3365.

206. Artavanis-Tsakonas, K., K. Eleme, K. L. McQueen, N. W. Cheng, P. Parham, D. M. Davis, and E. M. Riley. 2003. Activation of a subset of human NK cells upon contact with Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Immunol* 171:5396-5405.
207. Orago, A. S., and C. A. Facer. 1991. Cytotoxicity of human natural killer (NK) cell subsets for Plasmodium falciparum erythrocytic schizonts: stimulation by cytokines and inhibition by neomycin. *Clin Exp Immunol* 86:22-29.
208. Mavoungou, E., A. J. Luty, and P. G. Kremsner. 2003. Natural killer (NK) cell-mediated cytolysis of Plasmodium falciparum-infected human red blood cells in vitro. *Eur Cytokine Netw* 14:134-142.
209. Delahaye, N. F., M. Barbier, F. Fumoux, and P. Rihet. 2007. Association analyses of NCR3 polymorphisms with P. falciparum mild malaria. *Microbes Infect* 9:160-166.
210. Gill, R. G. 2010. NK cells: elusive participants in transplantation immunity and tolerance. *Curr Opin Immunol* 22:649-654.
211. Kean, L. S., K. Hamby, B. Koehn, E. Lee, S. Coley, L. Stempora, A. B. Adams, E. Heiss, T. C. Pearson, and C. P. Larsen. 2006. NK cells mediate costimulation blockade-resistant rejection of allogeneic stem cells during nonmyeloablative transplantation. *Am J Transplant* 6:292-304.
212. Hase, T., R. Yoshimura, S. Wada, Y. Wantanabe, A. Izawa, M. Isobe, T. Kishimoto, and J. Chargui. 2000. Role of natural killer cells in the rejection of transplanted hearts in the mouse model. *Transplant Proc* 32:2080-2081.
213. Fildes, J. E., N. Yonan, and C. T. Leonard. 2008. Natural killer cells and lung transplantation, roles in rejection, infection, and tolerance. *Transpl Immunol* 19:1-11.
214. Ashkar, A. A., and B. A. Croy. 2001. Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. *Semin Immunol* 13:235-241.
215. Ashkar, A. A., and B. A. Croy. 1999. Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol Reprod* 61:493-502.
216. Hanna, J., D. Goldman-Wohl, Y. Hamani, I. Avraham, C. Greenfield, S. Natanson-Yaron, D. Prus, L. Cohen-Daniel, T. I. Arnon, I. Manaster, R. Gazit, V. Yutkin, D. Benharroch, A. Porgador, E. Keshet, S. Yagel, and O. Mandelboim. 2006. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 12:1065-1074.
217. Manaster, I., and O. Mandelboim. 2010. The unique properties of uterine NK cells. *Am J Reprod Immunol* 63:434-444.
218. Moffett-King, A. 2002. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2:656-663.
219. Koopman, L. A., H. D. Kopcow, B. Rybalov, J. E. Boyson, J. S. Orange, F. Schatz, R. Masch, C. J. Lockwood, A. D. Schachter, P. J. Park, and J. L. Strominger. 2003. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 198:1201-1212.
220. Lash, G. E., S. C. Robson, and J. N. Bulmer. 2010. Review: Functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta* 31 Suppl:S87-92.
221. El Costa, H., A. Casemayou, M. Aguerre-Girr, M. Rabot, A. Berrebi, O. Parant, M. Clouet-Delannoy, L. Lombardelli, N. Jabrane-Ferrat, D. Rukavina, A. Bensussan, M. P. Piccinni, P. Le Bouteiller, and J. Tabiasco. 2008. Critical and differential roles of NKp46- and NKp30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *J Immunol* 181:3009-3017.
222. Colucci, F., S. Boulouvar, J. Kieckbusch, and A. Moffett. 2011. How does variability of immune system genes affect placentation? *Placenta* 32:539-545.
223. Hiby, S. E., R. Apps, A. M. Sharkey, L. E. Farrell, L. Gardner, A. Mulder, F. H. Claas, J. J. Walker, C. W. Redman, L. Morgan, C. Tower, L. Regan, G. E. Moore, M. Carrington, and A. Moffett. 2010. Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest* 120:4102-4110.

224. Hiby, S. E., L. Regan, W. Lo, L. Farrell, M. Carrington, and A. Moffett. 2008. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 23:972-976.
225. Hiby, S. E., J. J. Walker, M. O'Shaughnessy K, C. W. Redman, M. Carrington, J. Trowsdale, and A. Moffett. 2004. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 200:957-965.
226. Parham, P., and L. A. Guethlein. 2010. Pregnancy immunogenetics: NK cell education in the womb? *J Clin Invest* 120:3801-3804.
227. Flodstrom-Tullberg, M., Y. T. Bryceson, F. D. Shi, P. Hoglund, and H. G. Ljunggren. 2009. Natural killer cells in human autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 21:634-640.
228. Johansson, S., L. Berg, H. Hall, and P. Hoglund. 2005. NK cells: elusive players in autoimmunity. *Trends Immunol* 26:613-618.
229. Shi, F. D., H. G. Ljunggren, A. La Cava, and L. Van Kaer. 2011. Organ-specific features of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 11:658-671.
230. Jiao, Y. L., C. Y. Ma, L. C. Wang, B. Cui, J. Zhang, L. You, Z. J. Chen, J. F. Li, and Y. R. Zhao. 2008. Polymorphisms of KIRs gene and HLA-C alleles in patients with ankylosing spondylitis: possible association with susceptibility to the disease. *J Clin Immunol* 28:343-349.
231. Jiao, Y. L., B. C. Zhang, L. You, J. F. Li, J. Zhang, C. Y. Ma, B. Cui, L. C. Wang, Z. J. Chen, and Y. R. Zhao. 2010. Polymorphisms of KIR gene and HLA-C alleles: possible association with susceptibility to HLA-B27-positive patients with ankylosing spondylitis. *J Clin Immunol* 30:840-844.
232. Garcia-Leon, J. A., M. J. Pinto-Medel, L. Garcia-Trujillo, C. Lopez-Gomez, B. Oliver-Martos, I. Prat-Arrojo, C. Marin-Banasco, M. Suardiaz-Garcia, R. Maldonado-Sanchez, O. Fernandez-Fernandez, and L. Leyva-Fernandez. 2011. Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Spanish multiple sclerosis patients. *Mol Immunol* 48:1896-1902.
233. Perricone, R., C. Perricone, C. De Carolis, and Y. Shoenfeld. 2008. NK cells in autoimmunity: a two-edged weapon of the immune system. *Autoimmun Rev* 7:384-390.
234. Gambelunghie, G., A. Brozzetti, M. Ghaderi, P. Candeloro, C. Tortoioli, and A. Falorni. 2007. MICA gene polymorphism in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1110:92-98.
235. Tian, Z., M. E. Gershwin, and C. Zhang. 2012. Regulatory NK cells in autoimmune disease. *J Autoimmun* 39:206-215.
236. Jiang, W., N. R. Chai, D. Maric, and B. Bielekova. 2011. Unexpected role for granzyme K in CD56bright NK cell-mediated immunoregulation of multiple sclerosis. *J Immunol* 187:781-790.
237. Dotta, F., C. Fondelli, and A. Falorni. 2008. Can NK cells be a therapeutic target in human type 1 diabetes? *Eur J Immunol* 38:2961-2963.
238. Rodacki, M., B. Svoren, V. Butty, W. Besse, L. Laffel, C. Benoist, and D. Mathis. 2007. Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 56:177-185.
239. Poirot, L., C. Benoist, and D. Mathis. 2004. Natural killer cells distinguish innocuous and destructive forms of pancreatic islet autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8102-8107.
240. Van Belle, T. L., and M. G. von Herrath. 2009. The role of the activating receptor NKG2D in autoimmunity. *Mol Immunol* 47:8-11.
241. Feuerer, M., Y. Shen, D. R. Littman, C. Benoist, and D. Mathis. 2009. How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets. *Immunity* 31:654-664.
242. Gur, C., A. Porgador, M. Elboim, R. Gazit, S. Mizrahi, N. Stern-Ginossar, H. Achdout, H. Ghadially, Y. Dor, T. Nir, V. Doviner, O. Hershkovitz, M. Mendelson, Y. Naparstek, and O. Mandelboim. 2010. The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nat Immunol* 11:121-128.

243. Suwanai, H., M. A. Wilcox, D. Mathis, and C. Benoist. 2010. A defective Il15 allele underlies the deficiency in natural killer cell activity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:9305-9310.
244. Soderstrom, K., E. Stein, P. Colmenero, U. Purath, U. Muller-Ladner, C. T. de Matos, I. H. Tarner, W. H. Robinson, and E. G. Engleman. 2010. Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13028-13033.
245. Shi, F. D., H. B. Wang, H. Li, S. Hong, M. Taniguchi, H. Link, L. Van Kaer, and H. G. Ljunggren. 2000. Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nat Immunol* 1:245-251.
246. Casciola-Rosen, L., A. Miagkov, K. Nagaraju, F. Askin, L. Jacobson, A. Rosen, and D. B. Drachman. 2008. Granzyme B: evidence for a role in the origin of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 201-202:33-40.
247. Shi, F. D., and Q. Zhou. 2011. Natural killer cells as indispensable players and therapeutic targets in autoimmunity. *Autoimmunity* 44:3-10.
248. Thielens, A., E. Vivier, and F. Romagne. 2012. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Curr Opin Immunol* 24:239-245.
249. Vivier, E., P. Morin, C. O'Brien, B. Druker, S. F. Schlossman, and P. Anderson. 1991. Tyrosine phosphorylation of the Fc gamma RIII(CD16): zeta complex in human natural killer cells. Induction by antibody-dependent cytotoxicity but not by natural killing. *J Immunol* 146:206-210.
250. Mandelboim, O., P. Malik, D. M. Davis, C. H. Jo, J. E. Boyson, and J. L. Strominger. 1999. Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5640-5644.
251. Bryceson, Y. T., M. E. March, H. G. Ljunggren, and E. O. Long. 2006. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107:159-166.
252. Masilamani, M., G. Peruzzi, F. Borrego, and J. E. Coligan. 2009. Endocytosis and intracellular trafficking of human natural killer cell receptors. *Traffic* 10:1735-1744.
253. Campbell, K. S., and A. K. Purdy. 2011. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology* 132:315-325.
254. Moretta, L., and A. Moretta. 2004. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol* 16:626-633.
255. Lanier, L. L., B. C. Corliss, J. Wu, C. Leong, and J. H. Phillips. 1998. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 391:703-707.
256. Vales-Gomez, M., H. T. Reyburn, R. A. Erskine, and J. Strominger. 1998. Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14326-14331.
257. Faure, M., and E. O. Long. 2002. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol* 168:6208-6214.
258. Kikuchi-Maki, A., T. L. Catina, and K. S. Campbell. 2005. Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein. *J Immunol* 174:3859-3863.
259. Rajagopalan, S., and E. O. Long. 1999. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* 189:1093-1100.
260. Carosella, E. D., P. Moreau, J. Lemaoult, and N. Rouas-Freiss. 2008. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol* 29:125-132.

261. Ibrahim, E. C., N. Guerra, M. J. Lacombe, E. Angevin, S. Chouaib, E. D. Carosella, A. Caignard, and P. Paul. 2001. Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res* 61:6838-6845.
262. Seliger, B., and G. Schlaf. 2007. Structure, expression and function of HLA-G in renal cell carcinoma. *Semin Cancer Biol* 17:444-450.
263. Campoli, M., and S. Ferrone. 2008. Tumor escape mechanisms: potential role of soluble HLA antigens and NK cells activating ligands. *Tissue Antigens* 72:321-334.
264. Long, E. O., and N. Wagtmann. 1997. Natural killer cell receptors. *Curr Opin Immunol* 9:344-350.
265. Bashirova, A. A., M. P. Martin, D. W. McVicar, and M. Carrington. 2006. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7:277-300.
266. Uhrberg, M., N. M. Valiante, B. P. Shum, H. G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, B. Corliss, D. Tyan, L. L. Lanier, and P. Parham. 1997. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7:753-763.
267. Parham, P. 2005. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 5:201-214.
268. Rajagopalan, S., and E. O. Long. 2005. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J Exp Med* 201:1025-1029.
269. Khakoo, S. I., C. L. Thio, M. P. Martin, C. R. Brooks, X. Gao, J. Astemborski, J. Cheng, J. J. Goedert, D. Vlahov, M. Hilgartner, S. Cox, A. M. Little, G. J. Alexander, M. E. Cramp, S. J. O'Brien, W. M. Rosenberg, D. L. Thomas, and M. Carrington. 2004. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305:872-874.
270. Carrington, M., S. Wang, M. P. Martin, X. Gao, M. Schiffman, J. Cheng, R. Herrero, A. C. Rodriguez, R. Kurman, R. Mortel, P. Schwartz, A. Glass, and A. Hildesheim. 2005. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med* 201:1069-1075.
271. Nelson, G. W., M. P. Martin, D. Gladman, J. Wade, J. Trowsdale, and M. Carrington. 2004. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol* 173:4273-4276.
272. van der Slik, A. R., B. P. Koeleman, W. Verduijn, G. J. Bruining, B. O. Roep, and M. J. Giphart. 2003. KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. *Diabetes* 52:2639-2642.
273. Borrego, F., J. Kabat, D. K. Kim, L. Lieto, K. Maasho, J. Pena, R. Solana, and J. E. Coligan. 2002. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* 38:637-660.
274. Navarro, F., M. Llano, T. Bellon, M. Colonna, D. E. Geraghty, and M. Lopez-Botet. 1999. The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol* 29:277-283.
275. Vitale, M., R. Castriconi, S. Parolini, D. Pende, M. L. Hsu, L. Moretta, D. Cosman, and A. Moretta. 1999. The leukocyte Ig-like receptor (LIR)-1 for the cytomegalovirus UL18 protein displays a broad specificity for different HLA class I alleles: analysis of LIR-1 + NK cell clones. *Int Immunol* 11:29-35.
276. Lanier, L. L. 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23:225-274.
277. Brooks, A. G., P. E. Posch, C. J. Scorzelli, F. Borrego, and J. E. Coligan. 1997. NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor. *J Exp Med* 185:795-800.
278. Lanier, L. L., B. Corliss, J. Wu, and J. H. Phillips. 1998. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 8:693-701.

279. Plougastel, B., and J. Trowsdale. 1997. Cloning of NKG2-F, a new member of the NKG2 family of human natural killer cell receptor genes. *Eur J Immunol* 27:2835-2839.
280. Vales-Gomez, M., H. T. Reyburn, R. A. Erskine, M. Lopez-Botet, and J. L. Strominger. 1999. Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *Embo J* 18:4250-4260.
281. Kaiser, B. K., F. Barahmand-Pour, W. Paulsene, S. Medley, D. E. Geraghty, and R. K. Strong. 2005. Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. *J Immunol* 174:2878-2884.
282. Wu, J., Y. Song, A. B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L. L. Lanier, and J. H. Phillips. 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285:730-732.
283. Houchins, J. P., T. Yabe, C. McSherry, and F. H. Bach. 1991. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 173:1017-1020.
284. Shum, B. P., L. R. Flodin, D. G. Muir, R. Rajalingam, S. I. Khakoo, S. Cleland, L. A. Guethlein, M. Uhrberg, and P. Parham. 2002. Conservation and variation in human and common chimpanzee CD94 and NKG2 genes. *J Immunol* 168:240-252.
285. Groh, V., S. Bahram, S. Bauer, A. Herman, M. Beauchamp, and T. Spies. 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12445-12450.
286. Nausch, N., and A. Cerwenka. 2008. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* 27:5944-5958.
287. Salih, H. R., D. Goehlsdorf, and A. Steinle. 2006. Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Hum Immunol* 67:188-195.
288. Holdenrieder, S., P. Stieber, A. Peterfi, D. Nagel, A. Steinle, and H. R. Salih. 2006. Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer Immunol Immunother* 55:1584-1589.
289. Paschen, A., A. Sucker, B. Hill, I. Moll, M. Zapatka, X. D. Nguyen, G. C. Sim, I. Gutmann, J. Hassel, J. C. Becker, A. Steinle, D. Schadendorf, and S. Ugurel. 2009. Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. *Clin Cancer Res* 15:5208-5215.
290. Groh, V., A. Bruhl, H. El-Gabalawy, J. L. Nelson, and T. Spies. 2003. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9452-9457.
291. Qin, H., I. F. Lee, C. Panagiotopoulos, X. Wang, A. D. Chu, P. J. Utz, J. J. Priatel, and R. Tan. 2011. Natural killer cells from children with type 1 diabetes have defects in NKG2D-dependent function and signaling. *Diabetes* 60:857-866.
292. Lodoen, M. B., G. Abenes, S. Umamoto, J. P. Houchins, F. Liu, and L. L. Lanier. 2004. The cytomegalovirus m155 gene product subverts natural killer cell antiviral protection by disruption of H60-NKG2D interactions. *J Exp Med* 200:1075-1081.
293. Lenac, T., M. Budt, J. Arapovic, M. Hasan, A. Zimmermann, H. Simic, A. Krmpotic, M. Messerle, Z. Ruzsics, U. H. Koszinowski, H. Hengel, and S. Jonjic. 2006. The herpesviral Fc receptor fcr-1 down-regulates the NKG2D ligands MULT-1 and H60. *J Exp Med* 203:1843-1850.
294. Seiler, M., I. Brabcova, O. Viklicky, P. Hribova, C. Rosenberger, J. Pratschke, A. Lodererova, M. Matz, C. Schonemann, P. Reinke, H. D. Volk, and K. Kotsch. 2007. Heightened expression of the cytotoxicity receptor NKG2D correlates with acute and chronic nephropathy after kidney transplantation. *Am J Transplant* 7:423-433.
295. Bottino, C., R. Biassoni, R. Millo, L. Moretta, and A. Moretta. 2000. The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I-independent NK cell triggering. *Hum Immunol* 61:1-6.

296. Sivori, S., M. Vitale, L. Morelli, L. Sanseverino, R. Augugliaro, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 1997. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* 186:1129-1136.
297. Vitale, M., C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Castriconi, E. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta, and A. Moretta. 1998. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 187:2065-2072.
298. Pende, D., S. Parolini, A. Pessino, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, L. Accame, A. Malaspina, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 1999. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190:1505-1516.
299. Joyce, M. G., and P. D. Sun. 2011. The structural basis of ligand recognition by natural killer cell receptors. *J Biomed Biotechnol* 2011:203628.
300. Tang, Q., B. Grzywacz, H. Wang, N. Kataria, Q. Cao, J. E. Wagner, B. R. Blazar, J. S. Miller, and M. R. Verneris. 2008. Umbilical cord blood T cells express multiple natural cytotoxicity receptors after IL-15 stimulation, but only NKp30 is functional. *J Immunol* 181:4507-4515.
301. Yu, J., T. Mitsui, M. Wei, H. Mao, J. P. Butchar, M. V. Shah, J. Zhang, A. Mishra, C. Alvarez-Breckenridge, X. Liu, S. Liu, A. Yokohama, R. Trotta, G. Marcucci, Jr., D. M. Benson, T. P. Loughran, Jr., S. Tridandapani, and M. A. Caligiuri. 2011. NKp46 identifies an NKT cell subset susceptible to leukemic transformation in mouse and human. *J Clin Invest* 121:1456-1470.
302. Elboim, M., R. Gazit, C. Gur, H. Ghadially, G. Betser-Cohen, and O. Mandelboim. 2010. Tumor immunoediting by NKp46. *J Immunol* 184:5637-5644.
303. Gur, C., J. Enk, S. A. Kassem, Y. Suissa, J. Magenheimer, M. Stolovich-Rain, T. Nir, H. Achdout, B. Glaser, J. Shapiro, Y. Naparstek, A. Porgador, Y. Dor, and O. Mandelboim. 2011. Recognition and killing of human and murine pancreatic beta cells by the NK receptor NKp46. *J Immunol* 187:3096-3103.
304. Beilke, J. N., C. T. Meagher, K. Hosiawa, M. Champsaur, J. A. Bluestone, and L. L. Lanier. 2012. NK cells are not required for spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice. *PLoS One* 7:e36011.
305. Narni-Mancinelli, E., B. N. Jaeger, C. Bernat, A. Fenis, S. Kung, A. De Gassart, S. Mahmood, M. Gut, S. C. Heath, J. Estelle, E. Bertosio, F. Vely, L. N. Gastinel, B. Beutler, B. Malissen, M. Malissen, I. G. Gut, E. Vivier, and S. Ugolini. 2012. Tuning of natural killer cell reactivity by NKp46 and Helios calibrates T cell responses. *Science* 335:344-348.
306. Vieillard, V., J. L. Strominger, and P. Debre. 2005. NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10981-10986.
307. Arnon, T. I., M. Lev, G. Katz, Y. Chernobrov, A. Porgador, and O. Mandelboim. 2001. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* 31:2680-2689.
308. Esin, S., G. Batoni, C. Counoupas, A. Stringaro, F. L. Brancatisano, M. Colone, G. Maisetta, W. Florio, G. Arancia, and M. Campa. 2008. Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. *Infect Immun* 76:1719-1727.
309. Byrd, A., S. C. Hoffmann, M. Jarahian, F. Momburg, and C. Watzl. 2007. Expression analysis of the ligands for the Natural Killer cell receptors NKp30 and NKp44. *PLoS One* 2:e1339.
310. Pandey, R., C. M. DeStephan, L. A. Madge, M. J. May, and J. S. Orange. 2007. NKp30 ligation induces rapid activation of the canonical NF-kappaB pathway in NK cells. *J Immunol* 179:7385-7396.
311. Della Chiesa, M., S. Carlomagno, G. Frumento, M. Balsamo, C. Cantoni, R. Conte, L. Moretta, A. Moretta, and M. Vitale. 2006. The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface

- expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood* 108:4118-4125.
312. Kaifu, T., B. Escaliere, L. N. Gastinel, E. Vivier, and M. Baratin. 2011. B7-H6/NKp30 interaction: a mechanism of alerting NK cells against tumors. *Cell Mol Life Sci* 68:3531-3539.
 313. Li, Y., Q. Wang, and R. A. Mariuzza. 2011. Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6. *J Exp Med* 208:703-714.
 314. Neville, M. J., and R. D. Campbell. 1999. A new member of the Ig superfamily and a V-ATPase G subunit are among the predicted products of novel genes close to the TNF locus in the human MHC. *J Immunol* 162:4745-4754.
 315. Delahaye, N. F., S. Rusakiewicz, I. Martins, C. Menard, S. Roux, L. Lyonnet, P. Paul, M. Sarabi, N. Chaput, M. Semeraro, V. Minard-Colin, V. Poirier-Colame, K. Chaba, C. Flament, V. Baud, H. Authier, S. Kerdine-Romer, M. Pallardy, I. Cremer, L. Peaudecerf, B. Rocha, D. Valteau-Couanet, J. C. Gutierrez, J. A. Nunes, F. Commo, S. Bonvalot, N. Ibrahim, P. Terrier, P. Opolon, C. Bottino, A. Moretta, J. Tavernier, P. Rihet, J. M. Coindre, J. Y. Blay, N. Isambert, J. F. Emile, E. Vivier, A. Lecesne, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2011. Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med* 17:700-707.
 316. Ponnampalam, A. P., C. E. Gargett, and P. A. Rogers. 2008. Identification and hormonal regulation of a novel form of NKp30 in human endometrial epithelium. *Eur J Immunol* 38:216-226.
 317. Sivori, S., D. Pende, C. Bottino, E. Marcenaro, A. Pessino, R. Biassoni, L. Moretta, and A. Moretta. 1999. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol* 29:1656-1666.
 318. Mavoungou, E., J. Held, L. Mewono, and P. G. Kremsner. 2007. A Duffy binding-like domain is involved in the NKp30-mediated recognition of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes by natural killer cells. *J Infect Dis* 195:1521-1531.
 319. Pogge von Strandmann, E., V. R. Simhadri, B. von Tresckow, S. Sasse, K. S. Reiners, H. P. Hansen, A. Rothe, B. Boll, V. L. Simhadri, P. Borchmann, P. J. McKinnon, M. Hallek, and A. Engert. 2007. Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* 27:965-974.
 320. Simhadri, V. R., K. S. Reiners, H. P. Hansen, D. Topolar, V. L. Simhadri, K. Nohroudi, T. A. Kufer, A. Engert, and E. Pogge von Strandmann. 2008. Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS One* 3:e3377.
 321. Brandt, C. S., M. Baratin, E. C. Yi, J. Kennedy, Z. Gao, B. Fox, B. Haldeman, C. D. Ostrander, T. Kaifu, C. Chabannon, A. Moretta, R. West, W. Xu, E. Vivier, and S. D. Levin. 2009. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med* 206:1495-1503.
 322. Shibuya, K., L. L. Lanier, J. H. Phillips, H. D. Ochs, K. Shimizu, E. Nakayama, H. Nakauchi, and A. Shibuya. 1999. Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity* 11:615-623.
 323. Bottino, C., R. Castriconi, D. Pende, P. Rivera, M. Nanni, B. Carnemolla, C. Cantoni, J. Grassi, S. Marcenaro, N. Reymond, M. Vitale, L. Moretta, M. Lopez, and A. Moretta. 2003. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med* 198:557-567.
 324. El-Sherbiny, Y. M., J. L. Meade, T. D. Holmes, D. McGonagle, S. L. Mackie, A. W. Morgan, G. Cook, S. Feyler, S. J. Richards, F. E. Davies, G. J. Morgan, and G. P. Cook. 2007. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res* 67:8444-8449.

325. Chan, C. J., D. M. Andrews, N. M. McLaughlin, H. Yagita, S. Gilfillan, M. Colonna, and M. J. Smyth. 2010. DNAM-1/CD155 interactions promote cytokine and NK cell-mediated suppression of poorly immunogenic melanoma metastases. *J Immunol* 184:902-911.
326. Carlsten, M., N. K. Bjorkstrom, H. Norell, Y. Bryceson, T. van Hall, B. C. Baumann, M. Hanson, K. Schedvins, R. Kiessling, H. G. Ljunggren, and K. J. Malmberg. 2007. DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells. *Cancer Res* 67:1317-1325.
327. Gilfillan, S., C. J. Chan, M. Cella, N. M. Haynes, A. S. Rapaport, K. S. Boles, D. M. Andrews, M. J. Smyth, and M. Colonna. 2008. DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *J Exp Med* 205:2965-2973.
328. Carlsten, M., H. Norell, Y. T. Bryceson, I. Poschke, K. Schedvins, H. G. Ljunggren, R. Kiessling, and K. J. Malmberg. 2009. Primary human tumor cells expressing CD155 impair tumor targeting by down-regulating DNAM-1 on NK cells. *J Immunol* 183:4921-4930.
329. Sanchez-Correa, B., I. Gayoso, J. M. Bergua, J. G. Casado, S. Morgado, R. Solana, and R. Tarazona. 2012. Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. *Immunol Cell Biol* 90:109-115.
330. Platonova, S., J. Cherfils-Vicini, D. Damotte, L. Crozet, V. Vieillard, P. Validire, P. Andre, M. C. Dieu-Nosjean, M. Alifano, J. F. Regnard, W. H. Fridman, C. Sautes-Fridman, and I. Cremer. 2011. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res* 71:5412-5422.
331. Vitale, M., M. Falco, R. Castriconi, S. Parolini, R. Zambello, G. Semenzato, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 2001. Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur J Immunol* 31:233-242.
332. Dennehy, K. M., S. N. Klimosch, and A. Steinle. 2011. Cutting edge: NKp80 uses an atypical hemi-ITAM to trigger NK cytotoxicity. *J Immunol* 186:657-661.
333. Stark, S., and C. Watzl. 2006. 2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells. *Int Immunol* 18:241-247.
334. Chuang, S. S., P. R. Kumaresan, and P. A. Mathew. 2001. 2B4 (CD244)-mediated activation of cytotoxicity and IFN-gamma release in human NK cells involves distinct pathways. *J Immunol* 167:6210-6216.
335. Betser-Cohen, G., S. Mizrahi, M. Elboim, O. Alsheich-Bartok, and O. Mandelboim. 2010. The association of MHC class I proteins with the 2B4 receptor inhibits self-killing of human NK cells. *J Immunol* 184:2761-2768.
336. Veillette, A. 2006. NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adapters. *Immunol Rev* 214:22-34.
337. Parolini, S., C. Bottino, M. Falco, R. Augugliaro, S. Giliani, R. Franceschini, H. D. Ochs, H. Wolf, J. Y. Bonnefoy, R. Biassoni, L. Moretta, L. D. Notarangelo, and A. Moretta. 2000. X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J Exp Med* 192:337-346.
338. Sivori, S., M. Falco, E. Marcenaro, S. Parolini, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 2002. Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4526-4531.
339. Vacca, P., G. Pietra, M. Falco, E. Romeo, C. Bottino, F. Bellora, F. Prefumo, E. Fulcheri, P. L. Venturini, M. Costa, A. Moretta, L. Moretta, and M. C. Mingari. 2006. Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: Evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function. *Blood* 108:4078-4085.
340. Chakravarti, A. 1999. Population genetics--making sense out of sequence. *Nat Genet* 21:56-60.

341. Pritchard, J. K., and N. J. Cox. 2002. The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not? *Hum Mol Genet* 11:2417-2423.
342. Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J. F. Colombel, M. Sahbatou, and G. Thomas. 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:599-603.
343. Saxena, R., B. F. Voight, V. Lyssenko, N. P. Burt, P. I. de Bakker, H. Chen, J. J. Roix, S. Kathiresan, J. N. Hirschhorn, M. J. Daly, T. E. Hughes, L. Groop, D. Altshuler, P. Almgren, J. C. Florez, J. Meyer, K. Ardlie, K. Bengtsson Bostrom, B. Isomaa, G. Lettre, U. Lindblad, H. N. Lyon, O. Melander, C. Newton-Cheh, P. Nilsson, M. Orho-Melander, L. Rastam, E. K. Speliotes, M. R. Taskinen, T. Tuomi, C. Guiducci, A. Berglund, J. Carlson, L. Gianniny, R. Hackett, L. Hall, J. Holmkvist, E. Laurila, M. Sjogren, M. Sterner, A. Surti, M. Svensson, M. Svensson, R. Tewhey, B. Blumenstiel, M. Parkin, M. Defelice, R. Barry, W. Brodeur, J. Camarata, N. Chia, M. Fava, J. Gibbons, B. Handsaker, C. Healy, K. Nguyen, C. Gates, C. Sougnez, D. Gage, M. Nizzari, S. B. Gabriel, G. W. Chirn, Q. Ma, H. Parikh, D. Richardson, D. Rieke, and S. Purcell. 2007. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316:1331-1336.
344. Plenge, R. M., M. Seielstad, L. Padyukov, A. T. Lee, E. F. Remmers, B. Ding, A. Liew, H. Khalili, A. Chandrasekaran, L. R. Davies, W. Li, A. K. Tan, C. Bonnard, R. T. Ong, A. Thalamuthu, S. Pettersson, C. Liu, C. Tian, W. V. Chen, J. P. Carulli, E. M. Beckman, D. Altshuler, L. Alfredsson, L. A. Criswell, C. I. Amos, M. F. Seldin, D. L. Kastner, L. Klareskog, and P. K. Gregersen. 2007. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study. *N Engl J Med* 357:1199-1209.
345. Barrett, J. C., S. Hansoul, D. L. Nicolae, J. H. Cho, R. H. Duerr, J. D. Rioux, S. R. Brant, M. S. Silverberg, K. D. Taylor, M. M. Barmada, A. Bitton, T. Dassopoulos, L. W. Datta, T. Green, A. M. Griffiths, E. O. Kistner, M. T. Murtha, M. D. Regueiro, J. I. Rotter, L. P. Schumm, A. H. Steinhart, S. R. Targan, R. J. Xavier, C. Libioulle, C. Sandor, M. Lathrop, J. Belaiche, O. Dewit, I. Gut, S. Heath, D. Laukens, M. Mni, P. Rutgeerts, A. Van Gossum, D. Zelenika, D. Franchimont, J. P. Hugot, M. de Vos, S. Vermeire, E. Louis, L. R. Cardon, C. A. Anderson, H. Drummond, E. Nimmo, T. Ahmad, N. J. Prescott, C. M. Onnie, S. A. Fisher, J. Marchini, J. Ghorri, S. Bumpstead, R. Gwilliam, M. Tremelling, P. Deloukas, J. Mansfield, D. Jewell, J. Satsangi, C. G. Mathew, M. Parkes, M. Georges, and M. J. Daly. 2008. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 40:955-962.
346. Weissenbach, J. 1993. Microsatellite polymorphisms and the genetic linkage map of the human genome. *Curr Opin Genet Dev* 3:414-417.
347. Brookes, A. J. 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234:177-186.
348. Cargill, M., D. Altshuler, J. Ireland, P. Sklar, K. Ardlie, N. Patil, N. Shaw, C. R. Lane, E. P. Lim, N. Kalyanaraman, J. Nemesh, L. Ziaugra, L. Friedland, A. Rolfe, J. Warrington, R. Lipshutz, G. Q. Daley, and E. S. Lander. 1999. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22:231-238.
349. Ropers, H. H. 2007. New perspectives for the elucidation of genetic disorders. *Am J Hum Genet* 81:199-207.
350. Hugot, J. P., P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. M. Olson, J. C. Lee, L. Beaugier, I. Naom, J. L. Dupas, A. Van Gossum, M. Orholm, C. Bonaiti-Pellie, J. Weissenbach, C. G. Mathew, J. E. Lennard-Jones, A. Cortot, J. F. Colombel, and G. Thomas. 1996. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 379:821-823.
351. Cohen, J. C., R. S. Kiss, A. Pertsemlidis, Y. L. Marcel, R. McPherson, and H. H. Hobbs. 2004. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* 305:869-872.
352. International HapMap Consortium. 2003. The International HapMap Project. *Nature* 426:789-796.

353. International HapMap Consortium. 2005. A haplotype map of the human genome. *Nature* 437:1299-1320.
354. 1000 Genomes Project Consortium. 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467:1061-1073.
355. Blencowe, B. J. 2006. Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* 126:37-47.
356. Wang, E. T., R. Sandberg, S. Luo, I. Khrebtkova, L. Zhang, C. Mayr, S. F. Kingsmore, G. P. Schroth, and C. B. Burge. 2008. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456:470-476.
357. Cartegni, L., S. L. Chew, and A. R. Krainer. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3:285-298.
358. Bentwich, I., A. Avniel, Y. Karov, R. Aharonov, S. Gilad, O. Barad, A. Barzilai, P. Einat, U. Einav, E. Meiri, E. Sharon, Y. Spector, and Z. Bentwich. 2005. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 37:766-770.
359. Friedman, R. C., K. K. Farh, C. B. Burge, and D. P. Bartel. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19:92-105.
360. Cheung, V. G., L. K. Conlin, T. M. Weber, M. Arcaro, K. Y. Jen, M. Morley, and R. S. Spielman. 2003. Natural variation in human gene expression assessed in lymphoblastoid cells. *Nat Genet* 33:422-425.
361. Morley, M., C. M. Molony, T. M. Weber, J. L. Devlin, K. G. Ewens, R. S. Spielman, and V. G. Cheung. 2004. Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression. *Nature* 430:743-747.
362. Ueda, H., J. M. Howson, L. Esposito, J. Heward, H. Snook, G. Chamberlain, D. B. Rainbow, K. M. Hunter, A. N. Smith, G. Di Genova, M. H. Herr, I. Dahlman, F. Payne, D. Smyth, C. Lowe, R. C. Twells, S. Howlett, B. Healy, S. Nutland, H. E. Rance, V. Everett, L. J. Smink, A. C. Lam, H. J. Cordell, N. M. Walker, C. Bordin, J. Hulme, C. Motzo, F. Cucca, J. F. Hess, M. L. Metzker, J. Rogers, S. Gregory, A. Allahabadia, R. Nithiyananthan, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, P. Bingley, K. M. Gillespie, D. E. Undlien, K. S. Ronningen, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, D. A. Savage, A. P. Maxwell, D. J. Carson, C. C. Patterson, J. A. Franklyn, D. G. Clayton, L. B. Peterson, L. S. Wicker, J. A. Todd, and S. C. Gough. 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423:506-511.
363. Suhre, K., S. Y. Shin, A. K. Petersen, R. P. Mohny, D. Meredith, B. Wagele, E. Altmaier, P. Deloukas, J. Erdmann, E. Grundberg, C. J. Hammond, M. H. de Angelis, G. Kastenmuller, A. Kottgen, F. Kronenberg, M. Mangino, C. Meisinger, T. Meitinger, H. W. Mewes, M. V. Milburn, C. Prehn, J. Raffler, J. S. Ried, W. Romisch-Margl, N. J. Samani, K. S. Small, H. E. Wichmann, G. Zhai, T. Illig, T. D. Spector, J. Adamski, N. Soranzo, and C. Gieger. 2011. Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. *Nature* 477:54-60.
364. Fairfax, B. P., S. Makino, J. Radhakrishnan, K. Plant, S. Leslie, A. Dilthey, P. Ellis, C. Langford, F. O. Vannberg, and J. C. Knight. 2012. Genetics of gene expression in primary immune cells identifies cell type-specific master regulators and roles of HLA alleles. *Nat Genet* 44:502-510.
365. Gruden, K., M. Hren, A. Herman, A. Blejec, T. Albrecht, J. Selbig, C. Bauer, J. Schuchardt, M. Or-Guil, K. Zupancic, U. Svajger, B. Stabuc, A. Ihan, A. N. Kopitar, M. Ravnikar, M. Knezevic, P. Rozman, and M. Jeras. 2012. A "crossomics" study analysing variability of different components in peripheral blood of healthy caucasoid individuals. *PLoS One* 7:e28761.
366. Drachman, D. B. 1994. Myasthenia gravis. *N Engl J Med* 330:1797-1810.
367. Vincent, A. 2002. Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nat Rev Immunol* 2:797-804.
368. Patrick, J., and J. Lindstrom. 1973. Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science* 180:871-872.
369. Giraud, M., C. Vandiedonck, and H. J. Garchon. 2008. Genetic factors in autoimmune myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 1132:180-192.

370. Cheung, V. G., R. S. Spielman, K. G. Ewens, T. M. Weber, M. Morley, and J. T. Burdick. 2005. Mapping determinants of human gene expression by regional and genome-wide association. *Nature* 437:1365-1369.
371. Wang, Y. C., W. W. Sung, T. C. Wu, L. Wang, W. P. Chien, Y. W. Cheng, C. Y. Chen, S. H. Shieh, and H. Lee. 2012. Interleukin-10 haplotype may predict survival and relapse in resected non-small cell lung cancer. *PLoS One* 7:e39525.
372. De Maria, A., M. Fogli, S. Mazza, M. Basso, A. Picciotto, P. Costa, S. Congia, M. C. Mingari, and L. Moretta. 2007. Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur J Immunol* 37:445-455.
373. Vivier, E., and S. Ugolini. 2009. Regulatory natural killer cells: new players in the IL-10 anti-inflammatory response. *Cell Host Microbe* 6:493-495.
374. Fregni, G., A. Perier, G. Pittari, S. Jacobelli, X. Sastre, N. Gervois, M. Allard, N. Bercovici, M. F. Avril, and A. Caignard. 2011. Unique functional status of natural killer cells in metastatic stage IV melanoma patients and its modulation by chemotherapy. *Clin Cancer Res* 17:2628-2637.
375. Djeu, J. Y., K. Jiang, and S. Wei. 2002. A view to a kill: signals triggering cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 8:636-640.
376. Augugliaro, R., S. Parolini, R. Castriconi, E. Marcenaro, C. Cantoni, M. Nanni, L. Moretta, A. Moretta, and C. Bottino. 2003. Selective cross-talk among natural cytotoxicity receptors in human natural killer cells. *Eur J Immunol* 33:1235-1241.
377. Reefman, E., J. G. Kay, S. M. Wood, C. Offenhauser, D. L. Brown, S. Roy, A. C. Stanley, P. C. Low, A. P. Manderson, and J. L. Stow. 2010. Cytokine secretion is distinct from secretion of cytotoxic granules in NK cells. *J Immunol* 184:4852-4862.
378. Suzuki, Y., H. Onodera, H. Tago, R. Saito, M. Ohuchi, M. Shimizu, and Y. Itoyama. 2005. Altered populations of natural killer cell and natural killer T cell subclasses in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 167:186-189.
379. Mulcahy, H., K. P. O'Rourke, C. Adams, M. G. Molloy, and F. O'Gara. 2006. LST1 and NCR3 expression in autoimmune inflammation and in response to IFN-gamma, LPS and microbial infection. *Immunogenetics* 57:893-903.